

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年9月18日 (18.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/076623 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/48, C12P 21/02, G01N 33/50, 33/15, 33/53, A61K 45/00, 38/00, 39/395, A61P 35/00, 43/00

(TAMAI,Katsuyuki) [JP/JP]; 〒396-0111 長野県 伊那市 大字美篠 7448-374 Nagano (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02918

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 駒町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2003年3月12日 (12.03.2003)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書(30) 優先権データ:
特願2002-067702 2002年3月12日 (12.03.2002) JP

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 株式会社医学生物学研究所 (MEDICAL AND BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒460-0002 愛知県 名古屋市中区 丸の内 3 丁目 5 番 10 号 住友商事丸の内ビル 5 F Aichi (JP).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 正井 久雄 (MASAI,Hisao) [JP/JP]; 〒108-0073 東京都 港区 三田 5-7-8 シャンボール三田 620 号 Tokyo (JP).(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 玉井 克之

(54) Title: Cdc7-ASK KINASE COMPLEX, SUBSTRATE OF THE KINASE COMPLEX, ANTIBODY SPECIFIC TO THE SUBSTRATE, AND METHOD OF SCREENING COMPOUND CAPABLE OF INHIBITING Cdc7-ASK KINASE USING THE SAME

A1 (54) 発明の名称: Cdc7-ASK キナーゼ複合体、該キナーゼ複合体の基質、及び該基質に特異的な抗体、並びにこれらを用いた Cdc7-ASK キナーゼ阻害能を有する化合物のスクリーニング方法

3 (57) Abstract: It is intended to provide a method of assaying the kinase activity of a Cdc7-ASK kinase complex with the use of the phosphorylation level at the site to be phosphorylated in MCM, which is the substrate of the Cdc7-ASK kinase complex, as an indication. Based on this assay method, an effect of a test compound on the kinase activity of the Cdc7-ASK kinase complex can be also evaluated. A compound inhibiting the above kinase activity is useful as a carcinostatic agent having an excellent specificity to cancer.

WO 03/076623 A1 (57) 要約: 本発明は、Cdc7-ASK キナーゼ複合体の基質である MCM の、被リン酸化部位におけるリン酸化のレベルを指標とする、Cdc7-ASK キナーゼ複合体のリン酸化酵素活性測定方法を提供する。この測定方法に基づいて、被験化合物の Cdc7-ASK キナーゼ複合体のリン酸化酵素活性に与える影響を評価することもできる。当該リン酸化酵素活性を阻害する化合物は、がんに対する特異性に優れた制がん剤として有用である。

明細書

Cdc7-ASKキナーゼ複合体、該キナーゼ複合体の基質、
及び該基質に特異的な抗体、
並びにこれらを用いたCdc7-ASKキナーゼ阻害能を有する化合物の
スクリーニング方法

技術分野

本発明は、Cdc7-ASKキナーゼ複合体のリン酸化酵素活性測定方法に関する。

背景技術

細胞は増殖する際に、そのゲノムDNAを複製し、娘細胞へ均等に分配した後分裂するという過程を周期的に繰り返す。このような周期は細胞周期と呼ばれている。細胞周期はG1期(DNA合成準備期)、S期(DNA合成期)、G2期(分裂準備期)、M期(分裂期)に分けることができ、各段階を順番に経て細胞は分裂する。細胞周期の進行は数多くの分子により精緻な調節を受け、不必要的細胞の増殖を制御している。これまでに細胞周期の進行に関与する分子のクローニングや機能解析が数多く行われ、多くの癌においてこれらの細胞周期の進行に関する分子の異常が報告され、それが発癌の原因となっていると考えられている。

これまで、種々の制癌剤ないしは抗癌剤が開発してきた。癌細胞の増殖異常の原因の多くが、細胞周期の進行の異常に由来することが認識されるにしたがって、細胞周期進行制御因子を標的とした制癌剤が精力的に開発されている。中でも、機能の解析が進んでいるCdk-Cyclinは、抗癌剤の標的として最も広く研究されている。そしてCdk-Cyclinを標的とする多くの制癌剤の候補分子が既に報告されている。Cdkは多くの構造類似分子がファミリーを構成し、それぞれが種々の細胞周期特

- 2 -

異的なCyclin分子と複合体を形成して、細胞周期の種々のステージを制御する。現状では、これらの構造類似分子の中で、特定のCdk-Cyclinのみを特異的に阻害する分子の特定には至っていない。つまり、Cdk-Cyclinを標的として、癌細胞に対して特異的かつ選択的に作用する分子を得ることは難しかった。また、これまでのところ細胞分裂、あるいはG1(休止)期の制御因子を標的とした制癌剤は多く探索され、細胞増殖のもうひとつの重要な制御点であるDNA複製の過程を標的とした創薬は少なかつた。

さて、S期の開始時(G1-S移行)においては、Cdk-Cyclinとは別のセリン/スレオニンキナーゼが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。すなわち、細胞分裂周期変異株の一つとして単離されたCdc7変異株(J. Mol. Biol. 59:183-194, 1971)において、Cdc7蛋白質キナーゼは染色体DNAの複製の開始直前に機能すること、そしてS期を通じて各複製起点の活性化に必要であることが明らかにされた(Mol. Cell. Biol. 6:1590-1598, 1986; Genes Dev. 15:480-490, 1998; Genes Dev. 15:491-501, 1998)。また酵母Cdc7のキナーゼ活性は、制御サブユニットであるDbf4に依存することも知られている(Science 131:21-29, 1992; Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993)。

酵母におけるDbf4の発現は周期的で、転写レベルおよび翻訳後レベルの両方で制御されている(Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989)。G1-S境界期におけるCdc7キナーゼ活性の増加の少なくとも一部は、Dbf4の発現がG1後期に増加することによって説明されている(Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993; Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989)。更にDbf4は細胞内で複製起点と相互に作用する(Science 265:1243-1246, 1994)ことから、Cdc7は複製起点上に形成される複製装置を直接的に活性化することによりS期の開始をトリガーしていると考えられている。

本発明者は、既にヒトにおける酵母Dbf4のヒトにおけるホモログH37蛋白質とそれをコードするDNAの単離に成功している(特開2000-135090号公報、J. Biol. Chem. Vol. 275, No. 37, 29042-29052, 2000)。H37は、DNA複製の開始のon/offを司

る重要な制御因子である。H37は、後にヒトactivator of S phase kinase(ASK)と名付けられた。

ASKはヒト染色体上のユニークな遺伝子で、その機能は染色体複製に必須である。マウスを用いた発生工学的遺伝解析から、Cdc7の機能は細胞レベル及び動物レベルで必須であることが証明された。Cdc7はキナーゼ触媒サブユニットをコードし、ASKは活性サブユニットをそれぞれコードする。両者は複合体を形成し、活性を有するキナーゼとなる。Cdc7-ASKキナーゼの活性は細胞周期で厳密に制御されており、DNAの複製が起こるS期に上昇する。そのキナーゼ活性はS期を通じて高く保たれるが、M期からG1期には検出されなくなる。この活性制御は、主にASK蛋白質の発現レベルの変動に依存している。すなわち、ASK蛋白質はその量が細胞周期で変動し、その結果ASKが結合し制御するヒトCdc7キナーゼの活性も細胞周期中に変動する。

また増殖の盛んな癌細胞においては、一般にヒトCdc7-ASKの発現レベル、およびその活性の亢進が観察される。このような癌細胞ではASK蛋白質の発現の亢進によって、ヒトCdc7キナーゼ活性が増加していると考えられる。さらに興味深いことに、本発明者らはASKの発現レベルが種々の培養癌細胞においてその増殖能の上昇に呼応して増加していることを見出している。

本発明者のその後の研究によって、Cdc7-ASK複合体によってリン酸化される特異的な基質が、染色体の複製開始に必須なMCM(minichromosome maintenance)複合体(ヘテロ6量体)であることが証明された(J. Biol. Chem. Vol. 275, No. 37, 29042-29052, 2000)。このような知見を踏まえ、本発明者らは、Cdc7-ASKは複製開始複合体内に存在するMCMをリン酸化し、その結果サブユニット構造の再構成を誘導して複製開始に必須な二本鎖DNAの開裂を引き起こすというモデルを提唱している。

このような背景から、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化は、がん細胞の増殖制御における重要な現象であると認識されている。しかし、そのリン酸化の機構には、今なお解明すべき点が多く残されている。

発明の開示

本発明は、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化の機構を明らかにし、その活性を評価するための方法の提供を課題とする。また本発明は、前記評価方法に基づいて、被験化合物のCdc7-ASK複合体による基質のリン酸化作用に与える影響を測定するための方法の提供を課題とする。更に本発明は、これらの方法に有用な、基質、抗体、あるいはCdc7-ASK複合体の提供を課題とする。

本発明者らはCdc7-ASK複合体は制癌剤の新規かつ重要な標的になると考へた。つまり、Cdc7-ASK複合体のリン酸化作用に対する阻害剤は、癌細胞の増殖を選択的に抑制することができ、有効な制癌剤の候補になると考へた。

Cdc7-ASK複合体のリン酸化作用の阻害作用を評価するには、まずCdc7-ASK複合体のリン酸化作用を評価する方法の確立が必須である。この課題を解決するために、まず本発明者らは、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化の機構を明らかにした。そしてこの知見に基づいて、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を測定しうることを確認して本発明を完成した。

次に、このキナーゼ活性の測定方法を応用して、被験化合物のCdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化作用に与える影響を評価できることを見出した。この知見に基づいて、Cdc7-ASKキナーゼに対する被験化合物の阻害（または促進）作用を評価する方法と、このような作用を有する化合物のスクリーニング方法を確立し、本発明を完成した。

更に本発明者らは、これらの方法の確立を通じて、これらの方法に有用な新規な基質化合物、抗体、あるいはCdc7-ASK複合体等を見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法に関する。あるいは本発明は、被験化合物がCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を評価する方法、およびこの方法に基づくスクリーニング方法に関する。更に本発明は、これらの方法に有用な、基質化合物、抗体、あるいはCdc7-ASK複合体、若しくはそれらの調製方法に関する。

- 5 -

[1] 次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法。

a) 基質蛋白質を、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下でCdc7-ASK複合体と接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である、

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および

c) 前記リン酸化のレベルをを指標としてCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を測定する工程

[2] リン酸化のレベルを、前記セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体の結合のレベルに基づいて測定する[1]に記載の方法。

[3] Cdc7-ASK複合体が、生体試料に由来する[1]に記載の方法。

[4] 次の工程を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響の測定方法。

a) 被験化合物、基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを、次のi)～iii)のいずれかに記載の順序で接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である

i) 被験化合物と基質蛋白質とを接触後にCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる

ii) 被験化合物の共存下で、基質蛋白質とCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる、

iii) 基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを接触後に、被験化合物を接触させる

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および

c) 前記リン酸化のレベルをを指標として、被験化合物のCdc7-ASK複合体活性物

- 6 -

質のキナーゼ活性に与える影響を測定する工程

[5] 次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を調節する作用を有する化合物のスクリーニング方法。

a) [4] に記載の方法によって、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を測定する工程、および

b) 被験化合物を接触させない対照と比較して、リン酸化レベルが高い、または低い被験化合物を選択する工程

[6] [5] のb)において、リン酸化レベルが低い化合物を選択する、[5] に記載のスクリーニング方法。

[7] [6] のスクリーニング方法によって選択される化合物を有効成分として含有する、細胞増殖の抑制剤。

[8] 次の要素を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性測定用キット。

a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列の17位のセリン残基を含み、かつ当該アミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する基質蛋白質、および

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体

[9] 次の要素を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を評価するためのキット。

a) Cdc7-ASK複合体活性物質、および

b) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列の17位のセリン残基を含み、かつ当該アミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する基質蛋白質、

[10] 次の工程を含むCdc7-ASK複合体活性物質の製造方法。

a) ヒトCdc7蛋白質をコードするDNAと、配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAとを、モノシストロニックに発現可能な状態で原核細胞に導入する工程、

- 7 -

b) 前記 2 つの DNA を発現させる工程、および

c) 発現された蛋白質を回収する工程、

[1 1] 配列番号：1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質の 17 位セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体

[1 2] 以下の (a)～(d) のいずれかに記載の蛋白質。

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、

(b) 配列番号：3 に記載のアミノ酸配列から選択され、かつ 17 位のセリンを含む連続するアミノ酸配列からなる蛋白質、

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において、1 または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、ヒト

Cdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質

(d) 配列番号：3 に記載のアミノ酸配列と 90 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、ヒト Cdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質

[1 3] 配列番号：10 に記載のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号：9 に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質。

[1 4] 配列番号：10 に記載のアミノ酸配列からなる、[1 3] に記載のポリペプチド。

あるいは本発明は、[6] のスクリーニング方法によって選択される化合物を投与する工程を含む、細胞増殖の抑制方法に関する。また本発明は、[6] のスクリーニング方法によって選択される化合物の、細胞増殖の抑制剤の製造における使用に関する。

本発明は、次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法に関する。

a) 基質蛋白質を、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下で Cdc7-ASK複合体と接触さ

せる工程；ただし基質蛋白質は、配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である

b) 基質蛋白質の、配列番号：1 に示すアミノ酸配列において 17 位に相当する位置

のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および

c) 前記リン酸化のレベルを指標としてCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を測定する工程

本発明において、基質蛋白質としては、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質が用いられる。

MCM2蛋白質の構造は公知である。ヒトMCM2のアミノ酸配列とそれをコードするcDNAの塩基配列を、配列番号：2および配列番号：3にそれぞれ示した。Cdc7-ASK複合体は、配列番号：3に示すヒトMCM2の、特定のアミノ酸残基をリン酸化する。既Cdc7-ASK複合体が、MCM複合体、あるいはフリーのMCM2をリン酸化することは、既に本発明者らによって明らかにされている。しかし、MCM2のN末端から数えて17番目に位置するセリンが、Cdc7-ASK複合体によって特異的にリン酸化されることは、本発明者らが明らかにした新規な知見である。

したがって、17位セリンを含み、配列番号：3に示すアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を含む蛋白質は、Cdc7-ASK複合体によるリン酸化が可能な限り、本発明における基質蛋白質に用いることができる。この他本発明の基質蛋白質として、たとえば次の蛋白質を用いることができる。基質蛋白質には、タグを付加することができる。また後に述べるように、基質蛋白質を固相に結合させておくこともできる。

(a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、

(b) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列から選択され、かつ17位のセリンを含む連続するアミノ酸配列からなる蛋白質、

(c) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質

(d) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質

- 9 -

本発明において、ある蛋白質がCdc7-ASK複合体によってリン酸化されることは、たとえば実施例に記載したような反応の結果に基づいて、確認することができる。すなわち、リン酸化合物およびCdc7-ASK複合体とともに、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件（後述）の元でその蛋白質をインキュベートする。次に、その蛋白質の配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する。測定されたリン酸化のレベルが、たとえば配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質を基質蛋白質に用いた場合と有意な差が見られないとき、その蛋白質は、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質であると判定される。

本発明の基質蛋白質を構成するアミノ酸は、通常5以上、通常10以上、好ましくは50以上とすることができます。また基質蛋白質の大きさには制限はないが、たとえば400、通常300、あるいは200以下の短い断片とすることもできる。基質蛋白質を短い断片とすることによって、Cdc7-ASK複合体によるリン酸化をより特異的に観察することができる。

本発明において、好ましい基質蛋白質として、例えば配列番号：1のアミノ酸配列を含む蛋白質を示すことができる。配列番号：1のアミノ酸配列は、配列番号：3に示したヒトMCM2のN末端側の130アミノ酸からなる断片配列である。N末端から数えて17番目に位置するセリンが、Cdc7-ASK複合体によってリン酸化される。

この他、配列番号：1に記載のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質を基質蛋白質として用いることができる。本発明において変異の対象となるアミノ酸の数は、例えば1～10個であり、好ましくは1～6個、更に好ましくは1～3個である。

アミノ酸配列の変異は、人為的なものであっても、自然において生じる変異であってもよい。アミノ酸を置換する場合には、保存的置換を利用することができる。一般に蛋白質の機能の維持のためには、置換するアミノ酸は、置換前のアミノ酸と

- 1 0 -

類似の性質を有するアミノ酸であることが好ましい。このようなアミノ酸残基の置換が、保存的置換と呼ばれている。

例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、いずれも非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有する。また、非荷電性のアミノ酸としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。あるいは、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。更に、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。これらの各グループを構成するアミノ酸は、互いに似た性質を有している。そのため、グループ内の他のアミノ酸に置換したときに、蛋白質の機能が維持される可能性が高い。

このような蛋白質は、配列番号：1に記載のヒトMCM2のcDNAの塩基配列に変異を導入することによって得ることができる。既知の塩基配列からなる遺伝子に変異を導入する技術は公知である。あるいは、化学合成によって目的とするアミノ酸配列からなる蛋白質を調製することもできる。

本発明の基質蛋白質において、配列番号：1に示すアミノ酸配列における17位に相当する位置にあるセリンは、Cdc7-ASK複合体のリン酸化の標的として重要である。したがって、アミノ酸配列に変異を有する蛋白質を基質蛋白質として用いる場合であっても、17位、または17位に相同な位置にあるセリンは、保存することが重要である。17位に相同な位置とは、あるアミノ酸配列を配列番号：1のアミノ酸配列と整列させたときに、配列番号：1のアミノ酸配列における17位に相当する位置に配置される位置を言う。複数のアミノ酸配列を整列させる方法は公知である。たとえば、blastなどのアルゴリズムに基づいて、異なるアミノ酸配列を整列させるさまざまなソフトウェアが実用化されている。

また本発明の基質蛋白質として、配列番号：3に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質を用いることもできる。たとえばヒトCdc7-ASK複合体は、ヒトMCM2のみならず、マウスのMCM2もリン酸化する。したがって、マウスMCM2は、本発明に

- 1 1 -

おける基質蛋白質として利用することができる。マウスMCM2のアミノ酸配列は配列番号：5に、このアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：4に示した。マウスMCM2とヒトMCM2のホモロジーは、99%である。したがって、ヒト配列番号：3に記載のアミノ酸配列（ヒトMCM2の全長アミノ酸配列）と99%以上のホモロジーを有する蛋白質は、本発明の基質蛋白質として有用である。

ただし、本発明においては、ヒトMCM2の17位のセリン、またはこのセリンに相同な位置にあるセリンにおけるリン酸化のレベルを指標として測定している。配列番号：1や配列番号：3に示したアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列からなる蛋白質を基質蛋白質とする場合には、配列番号：1における17位、または17位に相同な位置にあるセリンを保存することが重要である。たとえばマウスのMCM2においては、26位のセリンが、17位に相同な位置にあるセリンとなる。したがって、マウスのMCM2断片を基質蛋白質に利用する場合には、26位のセリンを含むアミノ酸配列からなる蛋白質を用いるのが望ましい。

本発明の基質蛋白質は、遺伝子工学的な手法に基づいて得ることができる。すなわち、MCM2をコードするDNAを適当な発現系によって発現させることにより、目的とするアミノ酸配列を有する蛋白質を得ることができる。MCM2をコードするDNAの塩基配列は、配列番号：2に示した。

たとえば、大腸菌によってMCM2遺伝子を発現させた例を実施例に示した。発現産物は、塩析、グルロ過、あるいはイオン交換クロマトグラフィー等の手法を利用し、精製することができる。MCM2に結合親和性を有するタグを融合させておき、このタグに対する結合親和性物質を利用したアフィニティクロマトグラフィーによる精製を利用することもできる。結合性のタグとしては、数個のヒスチジンからなるヒスチジンタグ(His-Tag)、 β -D-ガラクトシダーゼ、GST (Glutathione S-transferase)、チオレドキシン、マルトース結合タンパク、Myc、Xpress、FLAG等を用いることができる。例えば、GSTを用いれば、発現した蛋白質をGlutathione Sepharose 4Bカラムなどで容易に精製することができる。

- 1 2 -

なお発現系によっては、MCM2がリン酸化された状態で回収される場合がある。基質蛋白質が発現系においてリン酸化されてしまった場合には、フォスファターゼ等のリン酸基に作用する酵素で処理することによって、蛋白質を脱リン酸化しておくこともできる。本発明の測定方法は、基質蛋白質のリン酸化を指標として測定する工程を含む。したがって、基質蛋白質の、特にCdc7-ASK複合体によってリン酸化される部位は、リン酸化されていない方が望ましい。また、目的とするアミノ酸配列からなる蛋白質を、化学的に合成する方法も公知である。

本発明のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法は、前記基質蛋白質と、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を測定すべき試料とを、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下で接触させる工程を含む。本発明において、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件とは、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の発現に好適な条件下を言う。より可能な条件としては、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の発現に適した温度、塩濃度、pHに調節され、かつ基質蛋白質のリン酸化のためのリン酸化合物を共存させる。酵素活性に適した条件とは、たとえば次のような条件を示すことができる。すなわち、pH7.0-7.5に調節されたHEPES緩衝液中で、上記成分を接触させることによって、このような反応条件を与えることができる。

また本発明において、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件とは、基質蛋白質のリン酸化に必要なリン酸基を有する化合物の存在下で、試料と基質蛋白質とを接触させることを言う。リン酸基は、たとえばアデノシン3'リン酸（以下、ATPと記載する）を共存させることにより、供給することができる。

前記反応を構成する基質蛋白質とリン酸化合物は、試料中のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に対して過剰となるように添加するのが望ましい。一般的には、試料に含まれるCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を正確に予測することは難しい。しかし当業者は、反応に必要な成分が酵素反応に不足しないように、予め十分量の基質化合物、あるいはリン酸化合物を経験的に設定することができる。たとえば、ヒトに由来する生体試料を測定する場合には、基質蛋白質としてたとえば0.1 μ g以上、

- 1 3 -

通常0.2~1 μ gを用いる。またリン酸化合物は、ATPとしてたとえば0.01mM以上、通常0.1~1mMとなるように添加すれば良い。なおリン酸化合物は、反応系に用いられる基質蛋白質のリン酸化に必要かつ十分な量を添加するようとする。

またリン酸化のための反応時間は、一般に10分以上、好ましくは30分以上、たとえば50~100分間の反応により、基質蛋白質の確実なリン酸化が期待できる。リン酸化に必要な時間は、基質蛋白質の使用量、反応液中のCdc-ASK複合体の活性のレベルによって変動する。当業者は、与えられた条件の元で、リン酸化に必要な反応時間を適宜設定することができる。

本発明の測定方法においては、一定時間内での基質蛋白質リン酸化のレベルが、試料中のリン酸化活性と相関する。あるいは、基質蛋白質を所定のレベルまでリン酸化するのに必要な反応時間を指標として、試料中のリン酸化活性を測定することもできる。すなわち、試料中のリン酸化活性が大きいほど、基質蛋白質のリン酸化は短時間で所定のレベルに達する。更に、基質蛋白質を所定のレベルまでリン酸化するのに必要な試料の量を指標として、試料中のリン酸化活性を測定することもできる。この態様においては、試料中のリン酸化活性の大きさに逆比例して、リン酸化に必要な試料の量は小さくなる。

なお試料中のリン酸化活性が予想をはるかに超える場合には、短時間のうちに基質蛋白質の大部分がリン酸化されてしまうことになる。このような状態では、正確にリン酸化活性を評価することができない可能性がある。したがって、このような結果となった場合には、反応に加える試料の量を少なくしたうえで改めてリン酸化活性を測定するのが望ましい。

本発明の測定方法は、基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程を含む。当該部位におけるリン酸化のレベルは、たとえば、17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化の状態を識別する抗体を使って、免疫学的に測定することができる。

- 1 4 -

より具体的には、17位に相当するセリンを含むアミノ酸配列からなる蛋白質の、リン酸化されたセリン残基を含む抗原決定基に対する結合活性と比較して、セリンの脱リン酸化によって結合活性が低下する抗体を用いることができる。あるいは逆に、リン酸化されていないセリン残基を含む抗原決定基に結合するが、当該セリン残基のリン酸化によって結合活性が低下する抗体を用いることもできる。

本発明の測定方法において、リン酸化のレベルを測定するために用いる、前記セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体は、たとえば次のようにして得ることができる。まず免疫原には、当該セリン残基を含む連続したアミノ酸配列からなる合成ペプチドを用いることができる。免疫原とする合成ペプチドの長さは、少なくとも3以上、たとえば5以上、通常10以上、好ましくは10～20アミノ酸とすることができる。たとえば、17位のセリンを含み、配列番号：1に記載のアミノ酸配列から選択された連続する15のアミノ酸で構成されるアミノ酸配列は、免疫原として好ましい。セリンの位置は、任意とすることができる。たとえば実施例においては、15アミノ酸の中央にセリンが位置するアミノ酸配列からなる合成ペプチドを免疫原としている。合成ペプチドは、キャリアー蛋白質と結合させることができる。キャリアー蛋白質としては、たとえばキーホールリンペプトヘモシアン等が用いられる。

免疫原における17位に相当するセリン残基は、リン酸化しておくことができる。特定のアミノ酸をリン酸化した合成ペプチドを得る方法は公知である。免疫原におけるセリンがリン酸化されていた場合には、リン酸化されたセリンに対する結合活性を有する抗体を得ることができる。

免疫原は、適当なアジュバントと混合して、免疫動物に投与される。免疫は、通常、複数回行われ、抗体価の十分な上昇を確認して、免疫動物の血液を採取する。採取された血液から回収された血清は、本発明の抗体を含む抗血清として用いることができる。抗血清からは、イムノグロブリンを精製することによって、精製抗体を得ることができる。

- 1 5 -

あるいは、免疫動物の抗体産生細胞を不死化し、目的とする反応性を有する抗体を産生するクローンを選択することによって、モノクローナル抗体を産生する細胞を樹立することもできる。たとえば、抗体産生細胞をミエローマなどと細胞融合させてハイブリドーマを作成すれば、抗体産生細胞を不死化することができる。

抗体が目的とする反応性を有することは、免疫原として用いた合成ペプチドを用いて確認することができる。たとえば、リン酸化されたセリンを含む合成ペプチドに結合する抗体を選択することによって、リン酸化した基質蛋白質を認識する抗体を得ることができる。更に、この抗体から、リン酸化していないセリンを含む合成ペプチドに結合する抗体を除くことにより、リン酸化した基質蛋白質に特異的に結合する抗体を得ることができる。このような選択工程によって、抗血清や精製抗体を処理することによって、本発明に必要な基質蛋白質のリン酸化状態を識別する抗体を得ることができる。

同様の選択工程にしたがってハイブリドーマが産生する抗体をスクリーニングすれば、基質蛋白質のリン酸化状態を識別しうるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

本発明の測定方法において、前記抗体は予め標識しておくことができる。抗体の標識によって、リン酸化部位に結合した抗体を容易に検出することができる。また、標識に由来するシグナルを増幅することができれば、より高感度な測定を期待することができる。

抗体の標識には、任意の標識成分を用いることができる。たとえば、蛍光色素、酵素、あるいは放射性物質等を標識として用いることができる。また、フェリチン、コロイド金等の電子密度の高い物質を標識に用いることもできる。

蛍光色素としては、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 、ローダミン β イソチオシアネート (RITC) 、フィコエリトリン (PE) 等が挙げられる。酵素としては、ペルオキシシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、シトクロムc等が挙げられる。

- 1 6 -

放射性物質としては、¹²⁵I、¹⁴C、³H等が挙げられる。これらの標識成分で抗体を標識する方法は公知である。

また、リン酸化状態を識別する抗体（一次抗体）に対して結合する抗体（以下、「二次抗体」という）を用いて抗体を標識することもできる。例えば、基質蛋白質にリン酸化状態を識別する抗体を接触させた後、二次抗体を反応させる。そして、間接的に基質に結合した2次抗体量を測定し、この測定量から一次抗体の結合量を求め、そして基質のリン酸化レベルを知ることができる。たとえば一次抗体にマウスモノクローナル抗体を用いる場合には、抗マウスIgGヤギ抗体を二次抗体として用いることができる。

あるいは、一次抗体を結合親和性物質で標識しておき、この親和性物質に対する結合パートナーの親和性を利用して、抗体を間接的に標識することもできる。たとえば一次抗体をアビジン化しておけば、ビオチン化した酵素をアビジン-ビオチン間の親和性によって、抗体に酵素を結合することができる。

本発明の測定方法においては、Cdc7-ASKの基質蛋白質を予め不溶性支持体に結合させ、固相化した状態で用いることができる。基質蛋白質を固相化することにより、前記リン酸化状態を識別する抗体との結合を容易に検出することができる。つまり、基質蛋白質に抗体を接触させた後、液相を分離して固相を洗浄することにより、結合した抗体と結合しなかった抗体は容易に分離される。その後、固相（または液相）における抗体を測定すれば、基質蛋白質に結合した（またはしなかった）抗体の量を容易に測定することができる。基質蛋白質の固相への固定化は、基質蛋白質の安定化にも貢献する。

基質蛋白質を固定化するための不溶性支持体としては、例えばポリスチレン樹脂、基質蛋白質を固定化するための不溶性支持体としては、例えばポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂、ガラス、やミセル粒子等の水に不溶性の物質が用いられ、特にその材質は限定されない。また、不溶性支持体の形状も特に限定されず、トレイ状、球状、棒状、纖維状、セル状、試験管状等の形状のものを採用することができる。基質蛋白質は、物理吸着、または化

- 1 7 -

学結合によって不溶性支持体に固相化することができる。基質蛋白質を固相化した不溶性支持体は、必要に応じてブロッキングすることができる。ブロッキングには、アルブミンやスキムミルクなどが用いられる。不溶性支持体のブロッキングにより、抗体の不溶性支持体に対する非特異的な結合が抑制される。また、ブロッキングによって基質蛋白質の保護作用も期待できる。

本発明において、基質蛋白質と結合した（またはしなかった）抗体の量は、試料中に存在するCdc7-ASK複合体のリン酸化酵素活性と関連付けられる。より具体的には、たとえば基質蛋白質のリン酸化されたセリンを含む抗原決定基に結合する抗体を用いた場合には、基質蛋白質に結合した抗体の量は、試料中のCdc7-ASK複合体のリン酸化酵素活性の大きさに比例する。リン酸化酵素活性のレベルが予めわかつているCdc7-ASK複合体標品による測定結果との対比によって、試料中のリン酸化酵素活性を定量的に知ることもできる。

本発明は、基質蛋白質のCdc7-ASKによる被リン酸化領域におけるリン酸化の状態に基づいて、そのキナーゼ活性を測定している。したがって、試料中に共存する可能性があるその他のリン酸化作用を有する物質の影響を受けることなく、Cdc7-ASKのキナーゼ活性を特異的に測定することができる。その結果、本発明の方法に基づいてCdc7-ASKのキナーゼ活性を測定することによって、細胞増殖の状態を特異的に検知することができる。

Cdc7-ASKは、細胞周期においては、特にS期に高い活性を維持し、G1期には活性が低下する。したがって、Cdc7-ASKのキナーゼ活性の測定は、細胞のG1期からS期への移行の指標として有用である。S期は細胞の増殖に備えて核酸の複製が進行する時期である。したがって、たとえばある生体試料中の細胞にS期にある細胞が多く見出されることは、その試料では、細胞の増殖が進行していることを意味している。より具体的には、癌組織中に本発明の測定方法によってCdc7-ASKのキナーゼ活性の高い細胞が多く見出されれば、その癌組織には活発に増殖している細胞が多く含まれることを示している。つまり、悪性度の高い癌である可能性がある。

- 1 8 -

また本発明は、次の工程を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響の測定方法に関する。

a) 被験化合物、基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを、次のi)～iii)のいずれかに記載の順序で接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である

i) 被験化合物と基質蛋白質とを接触後にCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる

ii) 被験化合物の共存下で、基質蛋白質とCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる、

iii) 基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを接触後に、被験化合物を接触させる

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および

c) 前記リン酸化のレベルを指標として、被験化合物のCdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性に与える影響を測定する工程

上記方法において、Cdc7-ASK複合体活性物質とは、Cdc7-ASK複合体と機能的に同等な複合体を言う。より具体的には、Cdc7-ASK複合体活性物質とは、基質蛋白質における被リン酸化セリンをリン酸化する作用を有する複合体と定義される。したがって、複合体を構成するCdc7、あるいはASKが、ヒト由来の蛋白質とは異なる構造を有するものであっても、当該活性を有する複合体を構成する場合には、本発明のCdc7-ASK複合体活性物質として利用することができる。

ある蛋白質複合体が、基質蛋白質における被リン酸化セリンをリン酸化する作用を有することは、たとえば実施例に示すような方法に基づいて確認することができる。すなわち、前記基質蛋白質とその蛋白質複合体とを、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下でインキュベートする。インキュベート後の基質蛋白質のリン酸化の

- 19 -

レベルが、ヒトCdc7-ASK複合体とインキュベートした場合と比較して、有意な差が見られない場合に、その蛋白質複合体は、Cdc7-ASK複合体と機能的に同等であると判定される。

ヒトに由来するCdc7とASKの構造は公知である。ヒトCdc7をコードするcDNAの塩基配列を塩基配列：6に、またヒトCdc7のアミノ酸配列を配列番号：7に示した。またヒトASKをコードするcDNAの塩基配列を配列番号：8に、またヒトASKのアミノ酸配列を配列番号：9に示した。これら公知のCdc7、あるいはASKに対して、本発明のCdc7-ASK複合体活性物質を構成する各サブユニットとして、たとえば次のような蛋白質を用いることができる。本発明において、天然のヒトCdc7、あるいはヒトASKと異なる構造を有するが、キナーゼ活性を有するCdc7-ASK複合体活性物質を構成することができるサブユニットを、それぞれCdc7サブユニット、およびASKサブユニットと言う。

まずCdc7サブユニットとしては、以下のポリヌクレオチドによってコードされ、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質を用いることができる。

(a) 配列番号：6に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド、
 (b) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド

オチド、

(c) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質をコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号：6 に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質をコードするポリヌクレオチド

- 2 0 -

本発明において、上記ポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質が、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成することは、次のようにして確認することができる。すなわち、まず上記ポリヌクレオチドをヒトASKをコードする塩基配列からなるDNAとともに適当な宿主細胞で共発現させる。得られた発現産物について、たとえば実施例に記載したような方法によって、リン酸化活性を評価し、Cdc7-ASKが有するリン酸化活性と比較する。その結果、両者のリン酸化活性に有意な差が見られない場合には、その複合体を構成するCdc7サブユニットは、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質であると判断される。

一方、ASKサブユニットとしては、以下のポリヌクレオチドによってコードされ、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質は、本発明のCdc7-ASK複合体活性物質を構成するASKサブユニットとして用いることができる。

- (a) 配列番号：8に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド、
- (b) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- (c) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質をコードするポリヌクレオチド
- (d) 配列番号：8に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチドとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質をコードするポリヌクレオチド

本発明において、上記ポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質が、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成す

- 2 1 -

ることは、次のようにして確認することができる。すなわち、まず上記ポリヌクレオチドをヒトCdc7をコードする塩基配列からなるDNAとともに適当な宿主細胞で共発現させる。得られた発現産物について、たとえば実施例に記載したような方法によって、リン酸化活性を評価し、Cdc7-ASKが有するリン酸化活性と比較する。その結果、両者のリン酸化活性に有意な差が見られない場合には、その複合体を構成するASKサブユニットは、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質であると判断される。

たとえば本発明者らは、ヒトASKを構成する674個のアミノ酸配列中、N末端側からカウントして174-349の位置に相当するアミノ酸配列からなる蛋白質は、Cdc7との複合体の形成と、キナーゼ活性の発現に必須の領域であることを明らかにした。当該領域を構成するアミノ酸配列を配列番号：10に示した。このようなヒトASK蛋白質の断片は、前記活性を有する限り、本発明におけるCdc7-ASK複合体活性物質を構成するASKサブユニットとして用いることができる。

本発明において、上記のCdc7サブユニット、あるいはASKサブユニットをコードするポリヌクレオチドは、任意のcDNAライブラリからPCRやハイブリダイズスクリーニングによって取得することができる。cDNAライブラリーとしては、ヒトをはじめとして、マウスやラットなどのヒト以外の哺乳動物、あるいは線虫や分裂酵母などの真核細胞に由来するライブラリーを用いることができる。

本発明のCdc7-ASK複合体活性物質は、細胞から抽出することもできるし、遺伝子工学的手法によって製造することもできる。遺伝子工学的な手法による製造方法は、多量の蛋白質を容易に得ることができるので望ましい。本発明のCdc7-ASK複合体活性物質として、たとえば昆虫細胞で発現させたヒトCdc7とASKからなる複合体を用いることができる。

たとえば本発明者らは、このような複合体の製造に既に成功している (J. Biol. Chem. Vol. 275, No. 37, 29042-29052, 2000)。より具体的には、たとえば次の工程a)-c)にしたがって昆虫細胞を利用して、本発明に用いるCdc7-ASK複合体活性物質

- 2 2 -

を得ることができる。

- a) ヒトCdc7サブユニットをコードするDNAと、ヒトASKサブユニットをコードするDNAとを昆虫細胞に導入するステップ、
- b) 前記昆虫細胞において、導入した前記二つのDNAを共発現させるステップ、及び
- c) 発現された蛋白質（複合体）を精製するステップ、

前記ステップa)で用いられるヒトCdc7サブユニットをコードするDNAは、前記a)-e)に記載のいずれかのポリヌクレオチドを用いることができる。また、その形態も限定されず、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAが含まれる。例えば、ヒトCdc7サブユニットをコードするDNAとして、配列番号：6に示した塩基配列を有するDNAを利用することができる。

同様に、ステップa)で用いられるヒトASKサブユニットをコードするDNAは、前記a)-e)に記載のいずれかのポリヌクレオチドを用いることができる。例えば、ヒトASK蛋白質をコードするDNAとして、配列番号：8に示した塩基配列を有するDNAを利用することができる。

昆虫細胞には、*Spodoptera Frugiperda*由来のSf9細胞やSf21細胞、*Trichoplusia ni*由来のTn5細胞を用いることができる。これらの細胞は市販されており（Invitrogen社製、Phamingen社製）、またATCCから入手することもできる。Cdc7サブユニット、およびASKサブユニットをコードするDNAは、バキュロウイルスを利用して昆虫細胞へ導入することができる。たとえば、トランスファーベクターへこれらのDNAをサブクローニングし、得られたプラスミドとバキュロウイルスDNAとを同時に昆虫細胞にトランスフェクションすることによって、相同組み換えにより組換え体ウイルスが作製される。この組換え体ウイルスを昆虫細胞に感染させ、昆虫細胞内でCdc7サブユニットとASKサブユニットとを共発現させる。発現される蛋白質量を増大させるために、この蛋白質の発現に先立って組換え体ウイルスの精製、增幅などを行うことが好ましい。

- 2 3 -

トランスファーベクターとしては、市販のpVL1392 (Pharmingen社製) 、pPAK8 (Clontech社製) 、pAcUW51 (Pharmingen社製) 、pAcUW31 (Clontech社製) 、pAcAB3 (Pharmingen社製) などを用いることができる。特に、Cdc7サブユニットおよびASKサブユニットを同時にサブクローニングできるものはトランスファーベクターとして好ましい。たとえば、pAcUW51 (Pharmingen社製) などのプロモーターを2つ有するトランスファーベクターや、pAcAB3 (Pharmingen社製) などのプロモーターを3つ有するトランスファーベクターを利用することにより、2つの遺伝子をサブクローニングすることができる。あるいは、Cdc7サブユニット、およびASKサブユニットをサブクローニングするトランスファーベクターとしてそれぞれ異なるものを利用することもできる。

また、バキュロウイルスDNAとしては、BaculoGold Linearized Baculovirus DNA (商品名、Pharmingen社製) 、野生型Baculovirus AcNV DNA (Pharmingen社製、Invitrogen社製) などを用いることができる。尚、バキュロウイルスを利用した発現系については各種キットが市販されており、それらを利用してもよい。

以上のトランスファーベクターとバキュロウイルスとを用いて、外来遺伝子であるCdc7サブユニットとASKサブユニットの遺伝子を昆虫細胞において共発現させることができる。発現可能な条件下で形質転換細胞を培養し、発現生成物を回収することにより、本発明に用いるCdc7-ASK複合体活性物質を得ることができる。回収を容易にするために、Cdc7およびASKのいずれか、あるいは両方に、適当なタグを融合させておくこともできる。

また、次に述べる方法にしたがって、原核細胞において、Cdc7サブユニットとASKサブユニットの複合体を得ることもできる。たとえば原核細胞として大腸菌を用いる場合には、以下の工程により、Cdc7-ASKキナーゼ複合体活性物質を調製することができる。

A) ヒトCdc7サブユニットをコードするDNAと、配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAとを、

- 2 4 -

モノシストロニックに発現可能な状態で大腸菌に導入する工程、

B)前記二つのDNAを発現させる工程、および

C)発現された蛋白質を回収する工程、

本発明者らの検討によれば、大腸菌の系においてはヒトASK蛋白質の全長ではなく部分ASK（配列番号：10）を導入して発現させることにより、最終的にキナーゼ活性を有するCdc7-ASK複合体活性物質を取得することができた。また本発明において、配列番号：10に示すアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質とは、Cdc7サブユニットと複合体を構成してキナーゼ活性を発現することができる蛋白質を言う。

ある蛋白質がCdc7サブユニットと複合体を構成してキナーゼ活性を発現することは、次のようにして確認することができる。すなわち、まずその蛋白質をコードするDNAをヒトCdc7をコードする塩基配列からなるDNAとともに適当な宿主細胞で共発現させる。得られた発現産物について、たとえば実施例に記載したような方法によって、リン酸化活性を評価し、Cdc7-ASKが有するリン酸化活性と比較する。その結果、両者のリン酸化活性に有意な差が見られない場合には、その複合体を構成するASKサブユニットは、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質であると判断される。

機能的に同等な蛋白質として、配列番号：10に示すアミノ酸配列と90%以上の相同性を有し、前記活性を保持した蛋白質を示すことができる。また、配列番号：10に示すアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、前記活性を保持した蛋白質は、機能的に同等な蛋白質に含まれる。変異を加えるアミノ酸の数は、通常20以下、たとえば10以下、好ましくは5以下、たとえば1～3である。アミノ酸は、保存的置換により置換することができる。本発明における機能的に同等な蛋白質には、配列番号：10に示すアミノ酸配列にタグを融合させた蛋白質が含まれる。

工程A)では、上記と同様のヒトCdc7サブユニットをコードするDNAと、ヒトASK

- 2 5 -

サブユニットの断片配列をコードするDNA（以下、略して「部分ASK」ともいう）が使用される。断片配列からなる蛋白質には、配列番号：10に示すアミノ酸配列からなる蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質を用いる。配列番号：10のアミノ酸配列は、配列番号：9に示すアミノ酸中、174番目のアミノ酸から349番目のアミノ酸までのアミノ酸配列に相当する部分配列である。配列番号：11に記載のアミノ酸配列は、配列番号：10に記載の塩基配列によってコードされている。配列番号：10に記載の塩基配列は、配列番号：8に示す塩基配列の1027位～1564位の塩基に相当する部分塩基配列である。このアミノ酸配列を含む蛋白質の断片は、ヒトCdc7と複合体を形成しキナーゼ活性の発現に必要な領域である。ここで、部分ASKは部分ASK蛋白質をコードする限りその配列は限定されず、コドンの縮重を考慮した任意の塩基配列を有するDNAが含有される。また、その形態も限定されず、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAが含有される。

本発明において、モノシストロニックに発現可能な状態とは、Cdc7サブユニットをコードするDNAとASKサブユニットをコードするDNAとが、1つのmRNA分子として転写され、2つの蛋白質分子に翻訳されることを言う。モノシストロニックに発現させるためには、これらのDNAを共通の転写制御領域の制御下に発現できるように配置する。また、2つの遺伝子の間にターミネータなどの転写を終結させる塩基配列が介在しないようにデザインする。更に、2つの遺伝子は接近して配置することが望ましい。ただし、両者の翻訳フレームが連続すると、1つの融合蛋白質として翻訳されてしまうので、両者の間には終止コドンを配置する。

またmRNA上の2つの蛋白質コード領域に対してそれぞれの翻訳を効率的に行わせるために、2つの遺伝子の間にRBS（リボソーム結合配列-Shine-Dalgano配列）を配置することは有効である。実施例において、ヒトCdc7と、配列番号：10にアミノ酸配列からなるヒト部分ASK蛋白質とを、大腸菌においてモノシストロニックに発現させるためのコンストラクトを示した。コンストラクトの構築に用いるベクターは、制限されない。具体的には、たとえば、実施例に示したようなpGEX-2Tな

- 2 6 -

どの市販のベクターのクローニングサイトに、Cdc7サブユニットと、ASKサブユニットをコードするDNAを順次クローニングすることによって、これらをモノシストロニックに発現可能なベクターとすることができます。

このようなベクターコンストラクトを、定法により大腸菌に形質転換し、その培養物から発現産物を回収することにより、目的とするCdc7-ASK複合体活性物質を得ることができる。

発現産物は、塩析、ゲルろ過、あるいはイオン交換クロマトグラフィー等の手法を利用して精製することができる。これらの遺伝子工学的手法による複合体の製造においては、複合体を構成するサブユニットのいずれか、あるいは両方に、タグを融合させることができる。サブユニットに結合親和性を有するタグを融合させておき、このタグに対する結合親和性物質を利用したアフィニティクロマトグラフで精製を利用することもできる。結合性のタグとしては、数個のヒスチジンによる精製を利用することもできる。結合性のタグとしては、数個のヒスチジンからなるヒスチジンタグ(His-Tag)、 β -D-ガラクトシダーゼ、GST (Glutathione S-transferase)、チオレドキシン、マルトース結合タンパク、Myc、Xpress、FLAG等を用いることができる。例えば、GSTを用いれば、発現した蛋白質をGlutathione Sepharose 4Bカラムなどで容易に精製することができる。

本発明の測定方法に用いる基質蛋白質としては、先に述べた本発明によるキナーゼ活性測定用の基質蛋白質を用いることができる。本発明において、被験化合物は、前記のi)-iii)に記載のいずれかの順序で、基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質と接触させられる。

i) 被験化合物と基質蛋白質とを接触後にCdc7-ASK複合体活性物質を接触させることによって、被験化合物の基質蛋白質に作用してキナーゼ活性を修飾する作用を見出すことができる。ii) 被験化合物の共存下で、基質蛋白質とCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる場合には、Cdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性に対する競合阻害活性を評価することができる。更に、iii) 基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを接触後に、被験化合物を接触させることにより、リン酸化された

- 27 -

基質蛋白質に対する被験化合物の脱リン酸化作用を検出することができる。

本発明において、基質蛋白質のリン酸化のレベルは、先に述べた本発明のキナーゼ活性の測定方法と同様の方法にしたがって測定することができる。たとえば、基質蛋白質の被リン酸化部位におけるリン酸化の状態を識別する抗体によって、リン酸化のレベルが測定される。

リン酸化のレベルの測定の結果は、被験化合物のCdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性に与える影響と関連付けられる。たとえば、被験化合物を接触させない対照と比較してリン酸化のレベルが低下した場合、被験化合物はリン酸化に対して阻害的に作用する活性を有すると結論付けられる。また被験化合物によってリン酸化活性が上昇する場合には、当該化合物がCdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性を促進する作用を有すると結論付けられる。

リン酸化レベルは、被験化合物を接触させない対照のみならず、キナーゼ活性に対する作用が明らかな化合物の測定結果と比較することもできる。たとえば、キナーゼ活性に対する阻害作用を見出すことを目的とする場合、一定の阻害作用を有することが予め確認されている化合物との比較によって、被験化合物の阻害作用の大きさを評価することもできる。更に、予めキナーゼ活性に対する阻害作用が明らかな物質について上記測定方法を実施しておき、その結果を被験化合物の測定結果と対比させることによって、その作用を定量的に評価することもできる。

本発明による被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響の測定方法に基づいて、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を調節する作用を有する化合物のスクリーニング方法を実施することができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を調節する作用を有する化合物のスクリーニング方法に関する。

- a) 前記方法によって、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を測定する工程、および
- b) 対照と比較して、リン酸化レベルが高い、または低い被験化合物を選択する工

程

本発明のスクリーニング方法において、リン酸化レベルは、被験化合物を接触させない対照のみならず、キナーゼ活性に対する作用が明らかな化合物の測定結果と比較することもできる。たとえば、キナーゼ活性に対する阻害作用を見出すことを目的とする場合、一定の阻害作用を有することが予め確認されている化合物との比較によって、被験化合物の阻害作用の大きさを評価することもできる。比較の結果、より阻害作用の大きな化合物を選択することによって、一定の水準以上の阻害作用を有する化合物をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング方法において、被験化合物としては、たとえば天然または合成された蛋白質、ペプチド、抗体、動植物や細菌の細胞抽出物、培養上清、あるいは低分子化合物などを用いることができる。これらの被験化合物は、化合物ライブラリーや、遺伝子ライブラリーから得ることもできる。

天然成分を被験化合物に用いる場合には、当業者に公知の方法（例えば、各種クロマトグラフィー）によりこれらを分画して、それぞれ検出を行うことにより、キナーゼ活性を阻害する単一の化合物を最終的に特定することが可能である。これらスクリーニングにより単離されたキナーゼ活性を阻害もしくは促進する化合物は、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の活性調整剤として利用することができる。

Cdc7-ASK複合体は、生体内においては細胞増殖におけるキーポイントとなっている。したがって、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の調節によって、細胞増殖を制御することができる。たとえば、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を阻害する化合物は、細胞増殖の抑制剤として有用である。より具体的には、本発明のスクリーニング方法によって選択されたCdc7-ASK複合体に対する阻害作用を有する化合物は、がんのような増殖を抑制すべき細胞の制御に有用である。

本発明のスクリーニング方法では、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化を特異的に検出している。その結果、本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物のCdc7-ASK複合体に対する作用は、より特異的であると言うことができる。

る。このような化合物は、たとえば癌の制御に用いる場合も、増殖段階にある細胞に対して特異的に作用することから、増殖性の細胞に対する選択性の高い薬剤として期待できる。

これらの化合物は、特にがん治療薬の候補化合物として有用である。本発明のスクリーニング法により単離される化合物を、キナーゼ活性の活性調整剤として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

加えて本発明は、上記測定方法、またはスクリーニングに用いる、質基質のリン酸化状態を識別することができる抗体を含むキットに関する。本発明のキットは、キナーゼ活性の検出に用いる場合には、前記抗体以外に、例えば基質蛋白質および緩衝液等で構成される。またキナーゼ活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニングに用いる場合には、さらにCdc7-ASK複合体活性物質を組み合わせる。基質蛋白質、あるいは前記抗体のいずれかは、上記のような標識を付与することができ、他方を固相化しておくことができる。

キットには、Cdc7-ASK複合体活性物質の活性や、測定系そのものの検定のために、酵素標品や基質蛋白質標品を組み合わせることができる。これらの標品や、前記抗体には、安定化などのための他の成分を加えることができる。例えば、1%程度のBSA、および終濃度0.2~10%（好ましくは1%）のシュークローズ、フルクトースなどのポリオール類を、標品中に凍結乾燥後の蛋白質変性防止剤として添加することができる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

- 3 0 -

図面の簡単な説明

図1は、ヒトASK、出芽酵母Dbf4、および分裂酵母Him1/Cfp1における、motif-Mとmotif-Cの配置を示した。

図2は、抗Mcm2-phospho-S17ポリクローナル抗体の特異性を確認した結果を示す。図中、縦軸は450 nmにおける吸光度を、横軸は抗体濃度(ng/ml)を示す。

図3は、Cdc7-ASK複合体活性物質の蛋白質リン酸化酵素活性を測定した結果を示す。図中、縦軸は450 nmにおける吸光度を、横軸は酵素量(μL)を示す。

図4は、Cdc7-ASK複合体の活性測定方法において、リン酸化反応液中に添加するATPの濃度を変化させたときの反応性の変化を調べた結果を示す。図中、縦軸は2mM ATPの濃度における反応性を100とする相対的活性値(%)を、横軸は反応液中のATPの終濃度(mM)を示す。

図5は、Cdc7-ASK複合体の活性測定方法において、リン酸化反応時間を変化させたときの反応性の変化を調べた結果を示す。図中、縦軸は450 nmにおける吸光度を、横軸は反応時間(分)を示す。

図6は、Cdc7-ASK複合体(野生型、WT)、および非活性型Cdc7-ASK複合体(KD)を用いた、ELISAによるリン酸化酵素活性の測定方法の評価結果を示す図。図中、縦軸は450 nmにおける吸光度を、横軸は酵素量(μL)を示す。

図7は、ラジオフィルターアッセイとELISA法による、リン酸化酵素活性の測定結果を示す図。図中、縦軸／左はELISAにおける測定結果(450 nmにおける吸光度)を、縦軸／右はラジオフィルターアッセイにおける測定結果(放射活性;cpm)を、また横軸は酵素量(μL)を示す。

図8は、既知のタンパク質リン酸化阻害剤の、Cdc7-ASK複合体リン酸化活性への影響の測定結果を示す図。図中、縦軸は相対的阻害値(%)、横軸は阻害剤の濃度(μM)を示す。

- 3 1 -

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。

実施例を構成する汎用されている手法は、全て下記の成書に従って行った。実施例で用いられている実験方法は、様々な成書に紹介されている方法を用いれば良く、何ら制限は無い。

J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
Ed Harlow and David Lane (1988) Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press

大海忍、辻村邦夫、稻垣昌樹 (1994) 細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ
抗ペプチド抗体実験プロトコール 株式会社 秀潤社

右田俊介、紺田進、本庶佑、濱岡利之 (1995) 免疫実験操作法 I・II, 株式会社
南江堂

(1) ASK活性ドメインの特定

本発明者らは、分裂酵母のHsk1-Him1/Dfp1を材料として、詳細な変異体解析を行った結果、Dbf4-motif-MとDbf4-motif-Cのみあれば、キナーゼ活性化に十分であることを報告している(Ogino K. et al., J Biol. Chem. 276:31376-31387, 2001)。分裂酵母のHsk1-Him1/Dfp1は、ヒトCdc7-Dbf4に相当する複合体である。この事実に基づいて、ヒトASKにおいてもmotif-Mとmotif-Cのみを含む最小ドメインでキナーゼ活性化に十分であろうと予想した。ヒトASK、出芽酵母Dbf4、および分裂酵母Him1/Cfp1における、motif-Mとmotif-Cの配置を比較した結果を図1に示す。

具体的には、配列番号：9に示すヒトASKのアミノ酸配列から、173から349番目に相当するアミノ酸配列(配列番号：10)を選択した。この領域をコードするDNAは、ちょうどintronで分断されている。イントロンの存在箇所は、機能的ドメインあるいは機能的モジュールの切れ目であることが多いと提唱されているため、この領域を選択した。

- 3 2 -

(2) Cdc7-ASK複合体活性物質発現用のベクター

大腸菌において、ヒトCdc7とASKの活性ドメインを発現させるために、GST-TAT-ASK(minimum)-HA-huCdc7というプラスミドを作製した。まずGST-TAT-ASK融合蛋白質発現ベクターGST-TAT11を作製した。その後、ASKの下流に制限酵素サイト(NotI)を導入し、このサイトにHA-Cdc7を挿入した。そのさい、HA-Cdc7の直前にRBS(リボソーム結合配列-Shine-Dalgano配列)を付加した。強力なRBSの付加により、GST-TAT-ASKからHA-Cdc7まで一続きで転写され、ひとつの転写産物から2つの蛋白質とともに効率良く翻訳することができた。具体的な操作は次に示すとおりである。

以下の2つのプライマーを用いて、ヒトASKのcDNAから173から349番目のアミノ酸をコードする領域をPCR法によって増幅した。

minimum ASK-N (HindIII)

CCC AAG CTT GAC ATT AGA TAC TAC ATT GAA (配列番号：1 1)

minimum ASK-C (EcoRI)

CCG GAA TTC TTT CTT TTT AGG TGT GTC CTT (配列番号：1 2)

得られた増幅生成物を精製し、GST-TAT11ベクターにクローニングした。このベクターには、GST-TAT-HindIII-ASK-EcoRIの順に各領域が配置されている。

GST-TAT11ベクターとしては、pGEX-2T-Tat11-TKベクターを用いた。このベクターは、11アミノ酸からなるTAT配列(YGRKKRRQRRR/配列番号：1 3)がGSTベクターに挿入された構造を有している。TKのHindIII-EcoRIサイトを消化して、別にPCRで増幅しておいたminimum ASKを挿入することができる。HindIIIのフレームはAAG CTTとなることから、このベクターではEcoRIサイトのすぐ下流に3FRAMEで停止コドンに達するため、翻訳はすぐに終了する。

次にEcoRI-NotIアダプター(AATTGCGGCCGC/配列番号：1 4)を用いて、GST-TAT-HindIII-ASK-EcoRIのEcoRIをNotIに置換した。続いて、次のプライマーを用いてヒトCdc7のcDNAからコード領域の全長を増幅した。

- 3 3 -

huCdc7-RBS-N(NotI) /配列番号：15

A TAA GAA TGC GGC CGC TAA Gaa gga gAT ATA CAT atg TAC CCC TAC GAC GTG

huCdc7C-NotI /配列番号：16

ATAAGAATGCGGCCGCTTATCACAGCTCATATCTT

huCdc7-RBS-N(NotI) の塩基配列中、RBSとATGに相当する領域を小文字で示した。ATG以下の塩基配列でコードされるアミノ酸配列は、MYPYDVPDYAFSPQRD (配列番号：17) となり、このうちMYPYDVPDがHAエピトープに相当する。このベクターでは、HAタグに続いてヒトCdc7の14番目以降のアミノ酸配列を連結したアミノ酸配列からなる蛋白質が発現される。先に述べたように強力なRBSを付加したため、2つの遺伝子はともに翻訳される。

なお、Cdc7については野生型とキナーゼ失活型を作製した。キナーゼ失活型はK90Eと呼ばれる、90番目のアミノ酸リジン(K)をグルタミン酸(E)に変異させたアミノ酸配列をからなる。

(3) 細菌におけるCdc7-ASK複合体活性物質の発現と精製

(2) で構築したベクターGST-TAT-ASK(minimum)-HA-huCdc7を、大腸菌C600lon-に常法により形質転換した。C600lon-は、大腸菌の主要なプロテアーゼであるlonを欠損した大腸菌株である。

形質転換した大腸菌は、40 μg/mlのアンピシリンを含有するLB培地200 mlに接種し、37°Cで培養した。培養液のOD600が0.5になったところで、IPTGを1 mMになるように添加し、さらに3時間培養した。菌を遠心で回収し、洗浄後、20mlのbufferA (40mM Hepes/KOH[pH7.6] 1mM EDTA, 40 mM potassium glutamate, 10% glycerol, 1 mM DTT) に懸濁した。超音波処理で細胞を破壊した後、遠心で可溶性画分と沈殿(不溶性画分)に分画した。可溶性画分に1mlのglutathione Sepharose 4Bを添加した。4°Cで1時間かくはんした後、遠心によってglutathione Sepharose 4Bを回収し、簡易カラムに詰めてbufferAでよく洗浄した。カラムボリュームの20倍量以上のbufferAを用い、溶出液のOD280が0.01以下になるまで洗浄した。その後、20 mM

- 3 4 -

glutathioneを含有するbufferA、引き続いて50 mM glutathioneを含有するbuffer Aで溶出した。

最終的に溶出された画分をSDS-PAGEで分離後に銀染色したところ、GST-ASK (約50 kDa) および、HA-Cdc7 (約65kDa) が精製されていることが確認された。

(4) 細菌によるMCM2(1-130)の発現と精製

Jurkat cellから、ISogen (ニッポンジーンCat No. 311-02501) を用いてtotal RNAを調製し、You-Prime First-Strand Beads (アマシャムファルマシア社Cat No. 27-9264-01) を用いてcDNAを作製した。このcDNAを錠型として、Expand High Fidelity PCR System (ベーリンガーマンハイム社Ca No. 1732-650) と下記のプライマーを用いてヒトMcm2(1-130)のcDNAを増幅した。得られた390bpのPCR産物を制限酵素BamHIとXhoIで消化後、大腸菌の発現ベクターであるpGEX-4T-1 (アマシャムファルマシア社) のBamHI / XhoIサイトにクローニングした。塩基配列を決定し、得られたcDNAの配列がヒトMCM2(1-130)であることを確認した。

PCRに使用したプライマーを以下に示す。

Forward : 5' -CAC GGA TCC ATG GCA TCC AGC CCG GCC CA-3' (配列番号 : 18)

Reverse : 5' -GTG CTC GAG CAT CGC TGT CAT ACA GGA GCC-3' (配列番号 : 19)

MCM2(1-130)/pGEX-4T-1を大腸菌DH5aに、形質転換した。その大腸菌を30°Cで約5時間培養した後、吸光度 (600nm) が0.8になったところで培養温度を20°Cに下げ、終濃度が0.2mMになるようにIPTGを加え、20°C、16時間培養後、集菌した。集めた大腸菌は、氷冷の可溶化緩衝液 (PBS, 0.1%TritonX100, 1mM PMSF) でけん摺し、水中で超音波破碎機を用いて溶解した。溶解した粗抽出液を高速遠心機で15000回転30分間遠心して、可溶性画分と不溶性画分とを分離した。それぞれをSDS-PAGE電気泳動を行ってGST-fusion Mcm2(1-130)が可溶性画分にあることを確認した。

2mlのGSH-Sepharose 4B (アマシャムファルマシア) 充填したカラムに可溶性画分を添加した後、洗浄液 (20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 5mM imidazole) 50mlで洗浄し、溶出液 (10mM Glutathione, 50mM Tris-HCl, pH9.6) で2mlずつ10本溶出し

- 3 5 -

た。吸光度(A280nm)を測定し0.1以上を集めて氷冷のPBSに一晩透析した。透析した蛋白は、抗MCM2特異抗体を用いたWestern Blottingにより、GST-fusion MCM2(1-130)であることを確認した。

(5) MCM2の被リン酸化部位の特定

まずヒト、マウス、カエル、ショウジョウバエ、分裂酵母、出芽酵母などの、MCM2の一次構造をアラインし、保存されているセリン、スレオニン残基を同定した。機能的に重要なリン酸化部位は種を越えて保存されているだろうという仮定に基づいて、これらの保存セリン、スレオニン残基が比較的クラスターを形成して数多く存在する部を8ヶ所(F1, F2, F3, F4, F5, F6 NF1, NF2)選定した。

各領域について、それぞれの部位で4-7残基のセリン、スレオニン残基をアラニンあるいは、グルタミン酸に置換した変異MCM2を作製した。変異体の作製は、オリゴヌクレオチドを用いた方法によった。これを、昆虫細胞発現ベクターUW31上にクローニングした。UW31は2種類の遺伝子産物を同時に発現することが可能なベクターであり、histidine-tagのついたMCM7とともに、各種変異MCM2を共発現する組み換えで、Histidine-tagのMCM4とMCM6を共発現する組み換えウイルス溶液とともに、昆虫細胞Sf9に共感染し、細胞抽出液を作製した。これから、ニッケルカラムによりMCM2-4-6-7複合体のaffinity精製をおこなった。

目的のMCM2-4-6-7複合体が溶出している画分をプールした。次にmonoQカラム(PharmaciaのSMARTシステムを使用)によりさらに、MCM2-4-6-7複合体を精製した。0.3-0.35M NaClに溶出されるピーク画分をプールし、透析し塩濃度を低下させてから、*in vitro*リン酸化反応の基質として使用した。

また、同時に、これらの保存部位の一部を含むポリペプチドをhistidine-tagあるいはGST-tag付きで作製し、大腸菌で発現し、精製した。これらの作製は、制限酵素サイトを付加したプライマーオリゴヌクレオチドで目的のコード領域を増幅し、histidine-tag発現ベクター(pT7-7/pQE30)あるいは、GST-fusion発現ベクター(pGEX-5X-3)にクローニングした。野生型およびアラニン置換変異体を発現した。

- 3 6 -

これらの発現ベクターをDE3あるいは、C600lon-株にそれぞれ導入し、発現誘導し、ニッケルカラムあるいはglutathione Sepharose beadsカラムでaffinity精製をおこなった。これらの蛋白質も*in vitro*リン酸化反応の基質として使用した。

変異体MCM2を含むMCM2-4-6-7蛋白質複合体を基質として用いた場合には、どの変異体においても、リン酸化が完全に消失することはなかった。そこで、リン酸化された野生型および変異体MCM2をトリプシン消化の後、2次元クロマトグラフィーにより展開し、スポットが消失するかどうかを解析し、リン酸化部位を限定した。

また、MCM2は*in vivo*においても*in vitro*においても、Cdc7によりリン酸化される結果SDS-PAGE上で移動度が下方にシフトする。この現象を指標として、シフトが消失する変異体の同定を試みた。

これらの結果から、MCM2のN端のCdkおよびCdc7によるリン酸化部位(S27/S41およびS26/S40)があることを同定した。さらにこのリン酸化が、SDS-PAGE上でシフトの原因となっていることを明らかにした。マウスMCM2の26位のセリン残基(S26)に相当するヒトMCM2の17位のセリン残基(S17)は、N末端130アミノ酸ポリペプチドを基質にした場合に効率よくCdc7によりリン酸化されることが明らかとなった。この結果に基づいて、ヒトMCM2のN末端130アミノ酸(配列番号: 1)からなる蛋白質を、後述のELISA測定法のための基質蛋白質として使用することにした。

(6) 抗リン酸化ペプチド抗体の作製

Cdc7-ASK複合体はヒトMcm2の17番目のセリン残基を特異的にリン酸化することが明らかになつたので、次に17番目のセリン残基のリン酸化を検出するための道具として、リン酸化された17番目のセリン残基を特異的に認識する抗リン酸化特異抗体を作製した。

被リン酸化部位として確定したヒトMCM2タンパク質の17番目のセリン残基を含む、10番目から20番目までのアミノ酸配列に相当する以下の2本のペプチドをペプチド合成機を用いて作製した。

リン酸化ペプチド (Mcm2-phospho-S17と記す) : CRGNPPLTS(p)S (配列番号: 2

- 3 7 -

0)

非リン酸化ペプチド (Mcm2-S17と記す) : CRGNPPLTSS (配列番号: 21)
上記のペプチド配列は、一文字表記で、アミノ末端からカルボキシル末端方向に記されている。S(p)は、リン酸化セリン残基を示す。アミノ末端のシステイン (C) 残基は、ペプチドをキャリアータンパク質に共有結合させるために導入したものである。これらのペプチドは、HPLCにより、95%以上の純度であることを確認した。リン酸化ペプチドは免疫原に用い、抗体力値の測定及び抗体精製にリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドを用いた。

合成した短いペプチド単独では抗原性が低いので、通常ペプチドをキャリアータンパク質に結合させて動物に免疫する。キャリアータンパク質としては、アルブミン、ミオグロビン、ヘモシアニン等が用いられるが、今回はヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, 以下KLH、CALBIOCHEM社製) を用いた。成書に従い phospho-Hs-S83とKLHを架橋剤であるMBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, SIGMA社製) を用いて共有結合させ、KLH-Mcm2-phospho-S17を合成した。

KLH-Mcm2-phospho-S17 20 μ g/100 μ lおよび10 μ g/100 μ lをそれぞれウサギおよびマウスの1回あたりの免疫に用いた。これに100 μ lのフロイト完全アジュバント (ヤトロン社製) を加え、エマルジョン化し免疫原とした。ウサギの背部への皮下注射にて免疫を行った。免疫は2週間ごと3回から5回行い、耳朶静脈から採血後その血清を回収した。抗体力値は、Mcm2-phospho-S17とMcm2-S17を固相化したマイクロタイタープレートを用いたELISA法で測定した。

十分な抗体力値の確認の後、翌週より、採血 (最初の1週間)、休息 (次の1週間)、免疫 (最後の1週間) を1サイクルとし、これを4回繰り返した。採血は、抗体力値の確認の際と同様に、耳朶静脈より行った。1回の採血あたり、およそ60～70mlの血液を採取した。最後の採血では、カテーテルを用いて心臓より直接血液を回収した。

- 3 8 -

採取した血液は、4°Cで一晩静置し、血清と血餅に分離させ、上澄み部分の血清を回収した。分離回収した血清に、終濃度 50 %となるように、硫酸アンモニウムを添加し攪拌後、遠心分離を行い、IgG分画を含む沈殿物に最小限のPBSを加え完全に溶解した後、PBSに対して透析を行った。完全に PBS に平衡化した後、この粗精製抗体分画をカラムにかけて、抗体を精製した。

特異化カラム作製には、Mcm2-phospho-S17合成ペプチドを用い、吸収用カラム作製には、Mcm2-S17合成ペプチドを用いた。合成ペプチド1 mgを5 mlの0.1 M炭酸緩衝液に溶解し、1 mM塩酸で平衡化したCNBr活性化セファロース 4B (ファルマシア社製) を加えた。4°Cで一晩穏やかに混和し、これをカラムに充填した。5~10倍量のPBSでカラムを洗浄後、セファロース 4B 表面に残っている活性基をプロッキングするために1 M Tris-HCl (pH7.5) でカラムを平衡化した。プロッキング後、PBSで洗浄および平衡化し、抗体精製に使用した。

抗リン酸化ペプチド抗体を精製するため、前述の粗精製抗体分画を特異化カラムに通した。PBS/0.1% TritonX100で洗浄した後、カラムに吸着している抗リン酸化ペプチド抗体を、0.17 M glycine-HCl (pH2.5)で溶出した。溶出した抗体は直ちに1 M Tris-HCl (pH8.0) を適量加えて中和し、PBS に対して透析し、抗Mcm2-phospho-S17抗体分画とした。完全に PBS に平衡化させた後、これを吸収用カラムであるMcm2-S17セファロース 4B カラムに通した。吸収用カラムに通すことにより、抗Mcm2-phospho-S17抗体分画中に存在する非リン酸化ペプチドとも反応する抗体を取り除くことができる。一方、抗リン酸化ペプチド特異抗体は、カラムに吸着せずに、カラムを素通りする。吸収カラムをPBS/0.1% TritonX100で洗浄し、吸収用カラムに結合した抗体は、0.17 M glycine-HCl (pH2.5)で溶出した。溶出後、カラムは、再びPBS/0.1% TritonX100 で平衡化し、非リン酸化ペプチド抗体がほぼ完全に吸収されるまで、抗Mcm2-phospho-S17抗体分画を吸収用カラムに、繰り返して通した。非リン酸化ペプチド感作プレートを用いた ELISA によって、非リン酸化ペプチドとも反応する抗体が除去できている事を確認した。リン酸化ペプチド

- 3 9 -

チド感作プレートを用いたELISAによって、そのリン酸化ペプチドに対する特異性を最終的に確認した。

ペプチドを $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように0.1M炭酸緩衝液に溶かした。これをELISA用の96穴マイクロタイタープレートに、1穴あたり $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。これを4°Cで一晩放置し感作した。感作後、ペプチド溶液を除き、ブロッキング溶液 (1% BSA, 5% Sucrose, 0.1% NaN_3 /PBS) を、1穴あたり $200 \mu\text{l}$ ずつ分注して、室温で1時間程度放置した。ブロッキング液を完全に除去し、ドラフト内で風乾させた (固相化)。

リン酸化ペプチド (Mcm2-phospho-S17) 固相化プレートは、それぞれ抗体力価の測定、抗リン酸化セリン残基特異抗体の吸収確認、抗リン酸化ペプチド抗体の特異性の確認に用いた。また、非リン酸化ペプチド (Mcm2-S17) 固相化プレートは、カムによる非特異抗体の吸収の確認に用いた。

力価検定用の血清は、PBSを用いて200倍希釈から、精製抗体は $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ から、4倍ずつ段階的に希釈し、希釈したサンプルは、感作プレート 1穴あたり $50 \mu\text{l}$ 添加した。添加後、室温に1時間静置した (1次抗体反応)。反応液を捨て、各穴を、PBSで4回以上洗浄した。Horseradish Peroxidase (HRP) で標識された抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (2次抗体) を PBSで適当に希釈し、これを各ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し、室温で30~60分間反応させた (2次抗体反応)。2次抗体はanti-Rabbit IgG (H+L-chain) conj. Peroxidase (MBL社製) を用いた。2次抗体反応液を捨て、各穴を、PBSで4回以上洗浄した。発色基質 ($750 \mu\text{M}$ TMB, Tetramethylbenzidine) 添加し、室温で30°Cで5~20分間発色させた (発色反応)。反応停止液 ($1.5\text{N H}_3\text{PO}_4$) を $50 \mu\text{l}$ ずつ加えて、発色反応を停止させた。最後に、マイクロプレートリーダーを用いて、450 nmにおける吸光度を測定した。

抗Mcm2-phospho-S17抗体を、それぞれ $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ (抗体) から4倍ずつ段階的に希釈し、リン酸化ペプチド (Mcm2-phospho-S17) 固相化プレートと非リン酸化ペプチド (Mcm2-S17) 固相化プレートを用いて、ELISA法にて特異性を確認した。

- 4 0 -

図2は抗Mcm2-phospho-S17ポリクローナル抗体の特異性を確認した結果である。この結果、抗体濃度が高くなるに従い、Mcm2-phospho-S17リン酸化ペプチド固相化プレートでは吸光度が高くなる一方で、Mcm2-S17非リン酸化ペプチド固相化プレートでは吸光度がほぼゼロを維持していることがわかる。したがって、当抗体はヒトの17番目のセリン残基のリン酸化を特異的に認識する抗体であることが証明された。

(7) Cdc7-ASK複合体リン酸化酵素活性測定用 ELISA 系の構築

96穴マイクロタイタープレート内でCdc7-ASK複合体リン酸化酵素活性を測定するためには、用いる基質となるヒトの17番目のセリン残基を含む領域の選択を行うために、用いる基質となるヒトの17番目のセリン残基を含む領域の選択を行つた。具体的には放射性同位元素を用いたリン酸化アッセイにおいてCdc7-ASK複合体の良い基質となることが分かったヒトMCM2の1-130番目および1-80番目のアミノ酸領域のGST融合タンパク質と、10番目から20番目までのアミノ酸配列に相当する非リン酸化ペプチド (Mcm2-S17) を基質として検討した。

0.1 M炭酸緩衝液 を用いてGST-Mcm2 (1-130 aa) およびGST-Mcm2 (1-80 aa) を5 μ g/ml に希釈し、ELISA 用マイクロタイタープレートに、1穴あたり50 μ lずつ分注して、4 °Cにて一晩感作した。感作溶液を除き、ブロッキング溶液 (1% BSA, 5% Sucrose, 0.1% NaN₃/PBS) を、1穴あたり200 μ lずつ分注して、室温で1 時間程度放置した。ブロッキング溶液を完全に除去し、ドラフト内で風乾させ、使用まで4 °Cで保存した。この操作によりマイクロタイタープレートの内壁にGST-Mcm2 (1-130 aa) およびGST-Mcm2 (1-80 aa) を固相化した。

リコンビナントタンパク質GST-Mcm2 (1-130 aa)、GST-Mcm2 (1-80 aa) あるいは非リン酸化ペプチド (Mcm2-S17) を固相化したウェル中において、タンパク質リン酸化反応を行う。その後、同じウェル中で、連続してELISA を行う。

1倍 (x1) から2倍ずつ64倍まで希釈したリコンビナントCdc7-ASK複合体希釈系列をリン酸化緩衝液を用いて調製した。これを50 μ lずつ固相化プレートのウェル中に添加した (タンパク質リン酸化反応)。30 °Cで一定時間保温した後、リン酸化

- 4 1 -

反応液を捨て、各ウェルをPBSで4回以上十分に洗浄した。1 μ g/ml となるように、抗体希釈液 (1% BSA, 0.1% NaN₃/PBS) で希釈した一次抗体、すなわち抗Mcm2-phospho-S17 ポリクローナル抗体を、各ウェルに50 μ l ずつ添加して、室温で30~60分間反応させた (1次抗体反応)。1次抗体反応液を捨て、各ウェルをPBSで4回以上十分に洗浄した。Horseradish Peroxidase (HRP) で標識された抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (2次抗体、MBL社) をPBSで1000倍に希釈し、これを各ウェルに50 μ l ずつ添加し、室温で30~60分間反応させた (2次抗体反応)。2次抗体反応液を捨て、各ウェルを、PBSで4回以上洗浄した。発色基質溶液を1ウェルあたり50 μ l 添加し5~20分間発色させた (発色反応)。反応停止液を50 μ l ずつ加えて、発色反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用いて、450 nmにおける吸光度を測定した。

結果を図3に示した。この結果より、本発明で提供される、抗リン酸化ペプチド抗体を用いたELISA法によって、Cdc7-ASK複合体活性物質のタンパク質リン酸化酵素活性を測定できることが明らかになった。このリン酸化酵素活性測定系に用いる基質は、リコンビナントタンパク質GST-Mcm2 (1-130 aa) が最も好ましいことが明らかになった。非リン酸化ペプチド (Mcm2-S17) がこの活性測定系に利用できない原因としてはリン酸化部位を含む領域が短く、Cdc7-ASK複合体が標的とする17番目のセリン残基を認識することが難しい事が予想される。また同様な考察を行うことによって、GST-Mcm2 (10-20 aa) も本測定系における基質の1つとして提供することも可能と考えられる。

上記のGST-Mcm2 (1-130aa) と抗Mcm2-phospho-S17 ポリクローナル抗体を用いるCdc7-ASK複合体の活性測定方法において、リン酸化反応液中に添加するATPの終濃度を1 μ Mから2 mMまで変化させたときの反応性の変化を調べた結果を図4に示す。酵素活性は2mMにおける反応性を100とする相対的活性値(%)で示した。0.1 mMでは90%の活性を示し、1 mMにおいてほぼ反応はプラトーに達している。低濃度のATP存在下においても、最大活性値の30%以上の活性を示すものの、明らかに、ATP

- 4 2 -

依存的な反応性を示した。

Cdc7-ASK複合体の活性測定方法において、リン酸化反応時間を0から150分間まで変化させたときの反応性の変化を調べた結果を図5に示す。反応時間依存的な吸光度の上昇が見られ、90分間においてほぼ反応はプラトーに達している。

本測定系において、他のリン酸化酵素を用いた場合の検討を行った。GST-Mcm2 (1-130 aa) 感作プレートと抗Mcm2-phospho-S17ポリクローナル抗体を用いた。酵素には前述のCdc7-ASK複合体 (野生型、WT) 、非活性型Cdc7-ASK複合体 (KD) を用い、それぞれの希釈系列にて活性測定を行った。

結果を図6に示す。Cdc7-ASK複合体 WTは酵素を4倍まで希釈するに従い、吸光度すなわち17番目のセリン残基のリン酸化が低下することが観察された。これはリン酸化酵素活性が存在しないCdc7-ASK複合体 KDでは観察されなかった。以上の事より、本測定系においてCdc7-ASK複合体特異的なリン酸化活性の測定が可能であることが証明された。

ラジオフィルターアッセイは、酸不溶性画分への放射性同位元素 [γ -³²P]ATPの取り込みを利用して、基質に対するリン酸化を検出する方法であり、リン酸化活性を測定する場合に頻用される。この方法と本発明で提供されるELISA測定系における感度を比較した。

1 μ gのリコンビナントタンパク質GST-Mcm2 (1-130 aa) に、1倍 (x1) から2倍ずつ64倍まで希釈したリコンビナントCdc7-ASK複合体希釈系列をリン酸化緩衝液を用いて調製し、全量を50 μ lにした。30 °Cで一定時間保温した後、1 mlの10% トリクロロ酢酸、0.2% $Na_4P_2O_7$ を加え反応を停止させた。この酸不溶性画分をGFCフィルター (Whatman社製) にトラップし、2% トリクロロ酢酸、0.02% $Na_4P_2O_7$ を用いて3回洗浄した。基質に取りこまれた [γ -³²P]ATPのカウントを液体シンチレーションカウンターで測定した。

結果を図7に示す。それぞれ1倍のCdc7-ASK複合体酵素濃度における、ラジオフィルターアッセイではカウント (cpm) をELISAでは吸光度を100%として相対値(%)

- 4 3 -

にて示した結果である。ELISA法による測定においては、x 8まで100%であることより、放射性同位元素[γ -³²P]ATPを用いた測定系と比較して、約1/8の酵素量で測定できることが示された。またELISA法で用いる基質の量は1ウェルに計算上0.25 μ gであるのに対し、ラジオフィルターアッセイでは約4倍量の1 μ g必要とする点、また酵素量ゼロにおけるバックグラウンドがELISA法ではほとんど存在しない事からも、放射性同位元素を使用せずに測定できる利点以上に、感度も高く、かつ用いる基質と酵素も少なくでき、本発明で提供されるELISA測定系がいかに優れているかが証明された。

リン酸化酵素の阻害剤として知られるK-252a (CALBIOCHEM社製) およびstaurosporineは、CaMキナーゼIIやプロテインキナーゼA、プロテインキナーゼC、プロテインキナーゼGなど、様々なリン酸化酵素の阻害剤として知られている。K-252a と staurosporineを用いて、本発明で提供されるELISA系にて検討した。それぞれの希釈系列を調製し、これとリン酸化アッセイ緩衝液で調製したCdc7-ASK複合体とを混合し、全量を50 μ lにした。これをGST-Mcm2 (1-130 aa) を固相化したウェルに添加し、前述の方法でCdc7-ASK複合体リン酸化活性をELISA法にて検討した。

結果を図8に示す。図8は、阻害剤を加えない場合の活性値を100とする相対的阻害値(%)で示した。各阻害剤のK-252aとstaurosporineは特異性の低いキナーゼの阻害剤であることから、Cdc7-ASK複合体によるリン酸化活性を濃度依存的に抑制する結果が得られた。IC50は両者とも2 μ Mであった。一方、Roscovitine、Olomoucine、およびU0126では、Cdc7-ASK複合体に対する濃度依存的な阻害作用が観察されなかった。Roscovitine、およびOlomoucineは、cdk2 inhibitorである。またU0126はMAP kinase inhibitorである。これらのキナーゼ阻害剤はCdc7-ASK複合体の活性を阻害しないことを示している。このことから、実際にCdc7-ASK複合体のリン酸化活性阻害剤の薬剤スクリーニングにも有効であることが示された。

産業上の利用の可能性

- 4 4 -

本発明によって、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質であるMCM2のリン酸化機構が明らかにされた。この知見に基づいて、基質蛋白質のCdc7-ASK複合体によるリン酸化を、より特異的に評価することが可能となった。つまり、本発明のリン酸化作用の測定方法は、Cdc7-ASK複合体のリン酸化作用を、特異的に評価しうる方法として有用である。たとえば増殖の盛んな癌細胞におけるCdc7-ASKのキナーゼ活性が亢進していることが明らかにされている (Gene 1998 Apr 28;211(1):133-40 A human homolog of the yeast CDC7 gene is overexpressed in some tumors and transformed cell lines. Hess GF, Drong RF, Weiland KL, Slightom JL, Sclafani RA, Hollingsworth RE. Cancer Research, Pharmacia, Upjohn, Inc., 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001, USA.)。したがって、ある癌細胞の増殖能を、Cdc7-ASK のキナーゼ活性に基づいて予測することができる。また本発明者らも多くのヒト癌細胞パネルでCdc7の発現量を正常細胞と比較し、ほとんどの培養癌細胞（纖維芽細胞系もリンホイド系も）でCdc7がきわめて強く発現されていることを確認した。したがって、本発明の方法によって評価することができるCdc7-ASKのキナーゼ活性は、癌化のマーカーとして有用である。本発明によれば、Cdc7-ASKのキナーゼ活性を特異的に評価することができる。したがって、癌細胞の増殖能をより特異的に評価することができる。

更に本発明は、上記測定方法を応用した、被験化合物のCdc7-ASK複合体のリン酸化作用に与える影響を評価する方法と、この評価方法に基づくスクリーニング方法を実現した。

本発明のCdc7-ASKキナーゼ活性の測定方法、あるいはその活性を調節する化合物のスクリーニング方法は、Cdc7-ASKを標的とした癌に対する創薬の開発や治療方法の開発に有用である。Cdc7-ASKを標的とすることは、公知の細胞内キナーゼ (Cdk-Cyclinなど) や蛋白質を標的とすることに比べて次のような利点を有する。第一に、Cdc7-ASKを標的とすることにより、より確実な活性の制御を期待することができる。Cdk-Cyclinが多くの類似遺伝子によってファミリーを構成しているこ

- 45 -

とに比べて、Cdc7-ASKはより限られた構造の分子で構成されている。したがって、Cdc7-ASKを標的とすることで、その活性を確実に制御することができる。

第二に、Cdc7-ASKを標的とすることにより、細胞増殖を特異的に制御することができる。Cdc7-ASKはS期の開始と進行に必要な因子である。その活性の喪失は直ちにS期進行の停止に至り、細胞の増殖が停止する。さらに遺伝子操作を施したマウスを用いた実験から、S期、すなわちDNAの複製の停止はDNA上に異常な構造を蓄積し、それはDNA損傷として感知されてp53の誘導、さらには細胞死が誘導される可能性が示唆されている。つまり、Cdc7-ASKの活性阻害により、癌細胞のS期進行を効果的にブロックし、さらに細胞死を誘導することにより効率よく癌細胞を除去できる可能性がある。

る可能性がある。第三に、Cdc7-ASKを標的とすることにより、まったく新しい細胞増殖の阻害剤の発見が期待される。Cdc7-ASKのキナーゼとしての構造は、キナーゼファミリーの中でもユニークである。またASKの構造もこれまで多くの研究がされてきたCyclin分子とは異なっており、キナーゼ活性化についてもこれまで知られていない新規の機構によるものと予測される。したがって、Cdc7-ASKを標的とした活性阻害物質の探索により、これまでの種々のキナーゼに対するスクリーニングでは見出されなかった全く新規な物質が見出される可能性が高い。このことは、たとえば制がん剤の研究開発において、新たなリード化合物の発見につながる可能性があることを意味している。

そして第四に、Cdc7-ASKを標的とすることにより、細胞死への誘導が期待できる。Cdc7-ASKの阻害物質と共に、これらのチェックポイントキナーゼに対する阻害物質も併用すれば、Cdc7-ASKの活性阻害によって引き起こされる、S期進行阻害による細胞死への誘導を増強できることが期待される。

このように、Cdc7-ASK複合体は、細胞周期において細胞増殖の初期の段階において細胞増殖を強化する。

- 4 6 -

て重要な役割を果たしている。しかも、そのリン酸化活性は、がん細胞の増殖能と比例している。つまり、Cdc7-ASK複合体の活性の制御によって、がん細胞の増殖をより特異的に制御することができる。したがって、本発明のスクリーニング方法は、がん細胞の増殖を特異的に制御しうる化合物を得る方法として有用である。

更に本発明のスクリーニング方法は、被験化合物のCdc7-ASK複合体のリン酸化作用に与える影響を、より特異的に評価することができる。その結果、がんに対してより特異的に作用する化合物を選択することができる。

本発明はまた、上記の各種の方法に必要な、Cdc7-ASK複合体活性物質の調製方法を提供した。本発明の方法によれば、原核細胞を利用して、Cdc7-ASK複合体と同様の活性を有する複合体を、容易に、かつ多量に調製することができる。

また発明は、Cdc7-ASK複合体によってリン酸化される基質蛋白質を提供する。本発明の基質蛋白質は、Cdc7-ASK複合体（あるいはCdc7-ASK複合体活性物質）による被リン酸化に必要な構造を有する蛋白質である。このような基質蛋白質の利用により、Cdc7-ASK複合体のリン酸化作用をより特異的に評価することができる。本発明に基づいて調製されたCdc7-ASK複合体活性物質や基質蛋白質は、上記方法に有用である。

加えて本発明は、Cdc7-ASK複合体あるいはCdc7-ASK複合体活性物質によってリン酸化された基質蛋白質の、リン酸化レベルを識別する抗体を提供した。本発明の抗体は、基質蛋白質の特定の部位におけるリン酸化のレベルを識別する。この抗体によって、Cdc7-ASK複合体あるいはCdc7-ASK複合体活性物質のリン酸化作用を、より特異的に評価することが可能となる。また、本発明の抗体の利用によって、Cdc7-ASK複合体あるいはCdc7-ASK複合体活性物質のリン酸化作用を、イムノアッセイの原理に基づいて容易に評価することができる。

請求の範囲

1. 次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法。
 - a) 基質蛋白質を、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下でCdc7-ASK複合体と接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である、
 - b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および
 - c) 前記リン酸化のレベルを指標としてCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を測定する工程
2. リン酸化のレベルを、前記セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体の結合のレベルに基づいて測定する請求項1に記載の方法。
3. Cdc7-ASK複合体が、生体試料に由来する請求項1に記載の方法。
4. 次の工程を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響の測定方法。
 - a) 被験化合物、基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを、次のi)～iii)のいずれかに記載の順序で接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である
 - i) 被験化合物と基質蛋白質とを接触後にCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる
 - ii) 被験化合物の共存下で、基質蛋白質とCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる、
 - iii) 基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを接触後に、被験化合物を接触させる
 - b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する

- 4 8 -

位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および

c) 前記リン酸化のレベルを指標として、被験化合物のCdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性に与える影響を測定する工程

5. 次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を調節する作用を有する化合物のスクリーニング方法。

a) 請求項4に記載の方法によって、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を測定する工程、および

b) 被験化合物を接触させない対照と比較して、リン酸化レベルが高い、または低い被験化合物を選択する工程

6. 請求項5のb)において、リン酸化レベルが低い化合物を選択する、請求項5に記載のスクリーニング方法。

7. 請求項6のスクリーニング方法によって選択される化合物を有効成分として含有する、細胞増殖の抑制剤。

8. 次の要素を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性測定用キット。

a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列の17位のセリン残基を含み、かつ当該アミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する基質蛋白質、および

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体

9. 次の要素を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を評価するためのキット。

a) Cdc7-ASK複合体活性物質、および

b) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列の17位のセリン残基を含み、かつ当該アミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する基質蛋白質、

10. 次の工程を含むCdc7-ASK複合体活性物質の製造方法。

a) ヒトCdc7蛋白質をコードするDNAと、配列番号：10に記載のアミノ酸配列か

- 4 9 -

らなる蛋白質または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAとを、モノシストロニックに発現可能な状態で原核細胞に導入する工程、

b) 前記2つのDNAを発現させる工程、および

c) 発現された蛋白質を回収する工程、

1 1. 配列番号：1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質の17位セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体

1 2. 以下の(a)～(d)のいずれかに記載の蛋白質。

(a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、

(b) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列から選択され、かつ17位のセリンを含む連続するアミノ酸配列からなる蛋白質、

(c) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質

(d) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質

1 3. 配列番号：10に記載のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号：9に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質。

1 4. 配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなる、請求項13に記載のポリペプチド。

図 1

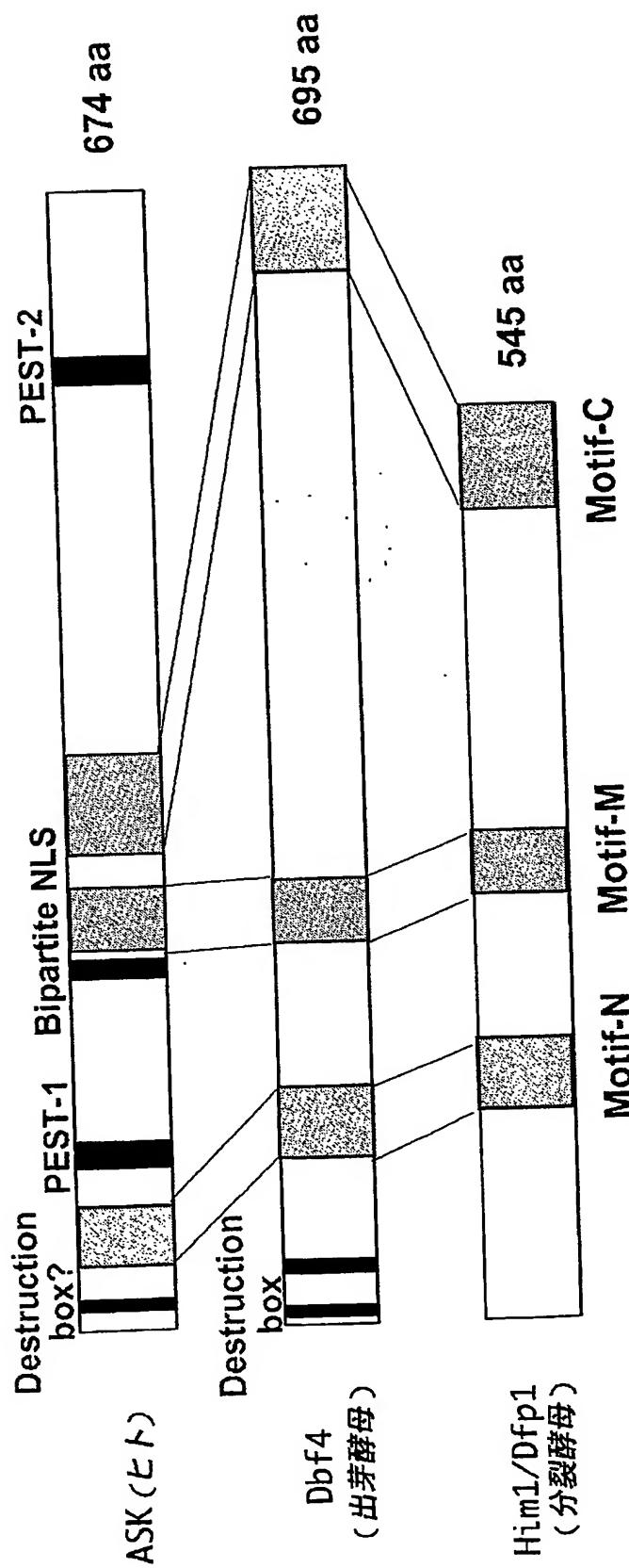


図 2

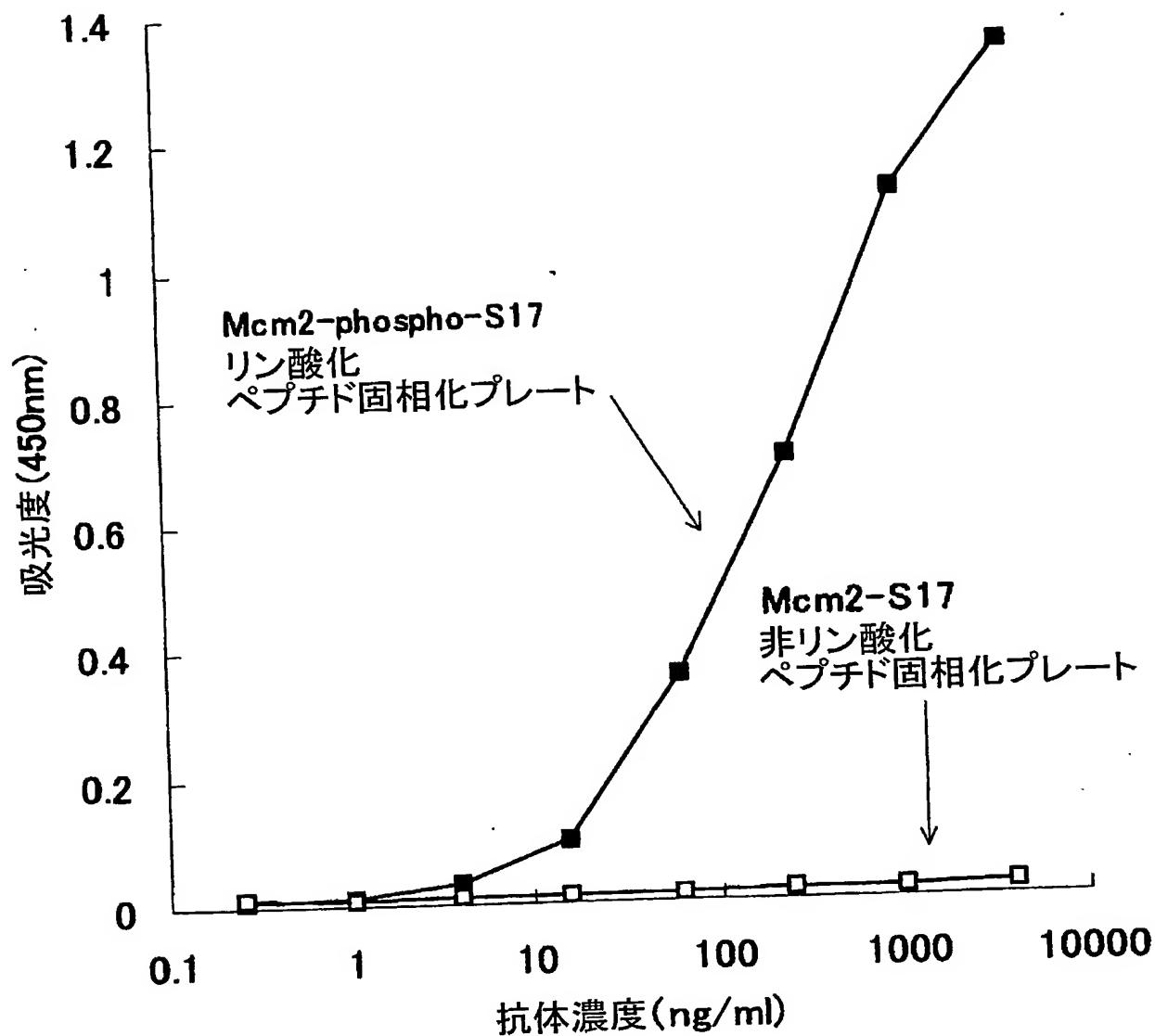


図 3

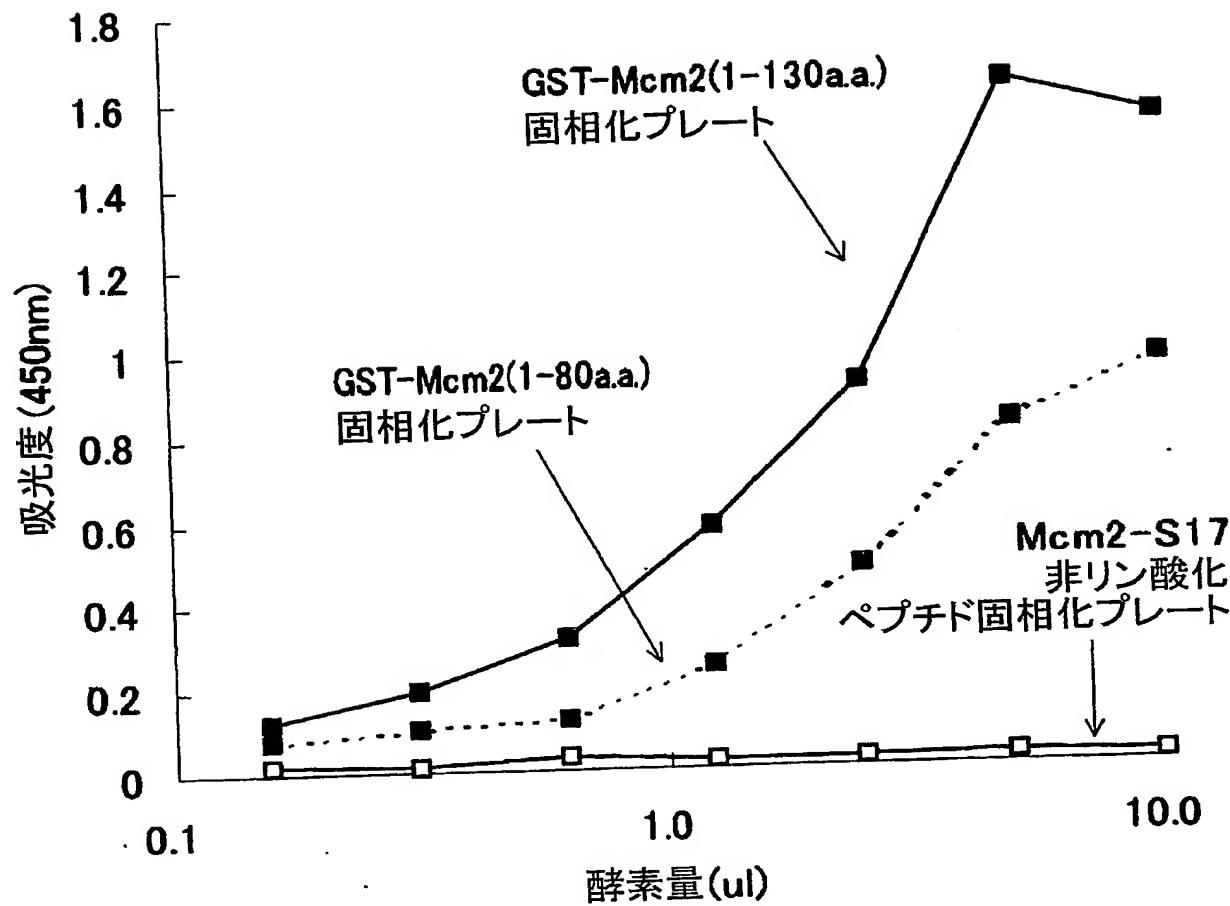


図 4

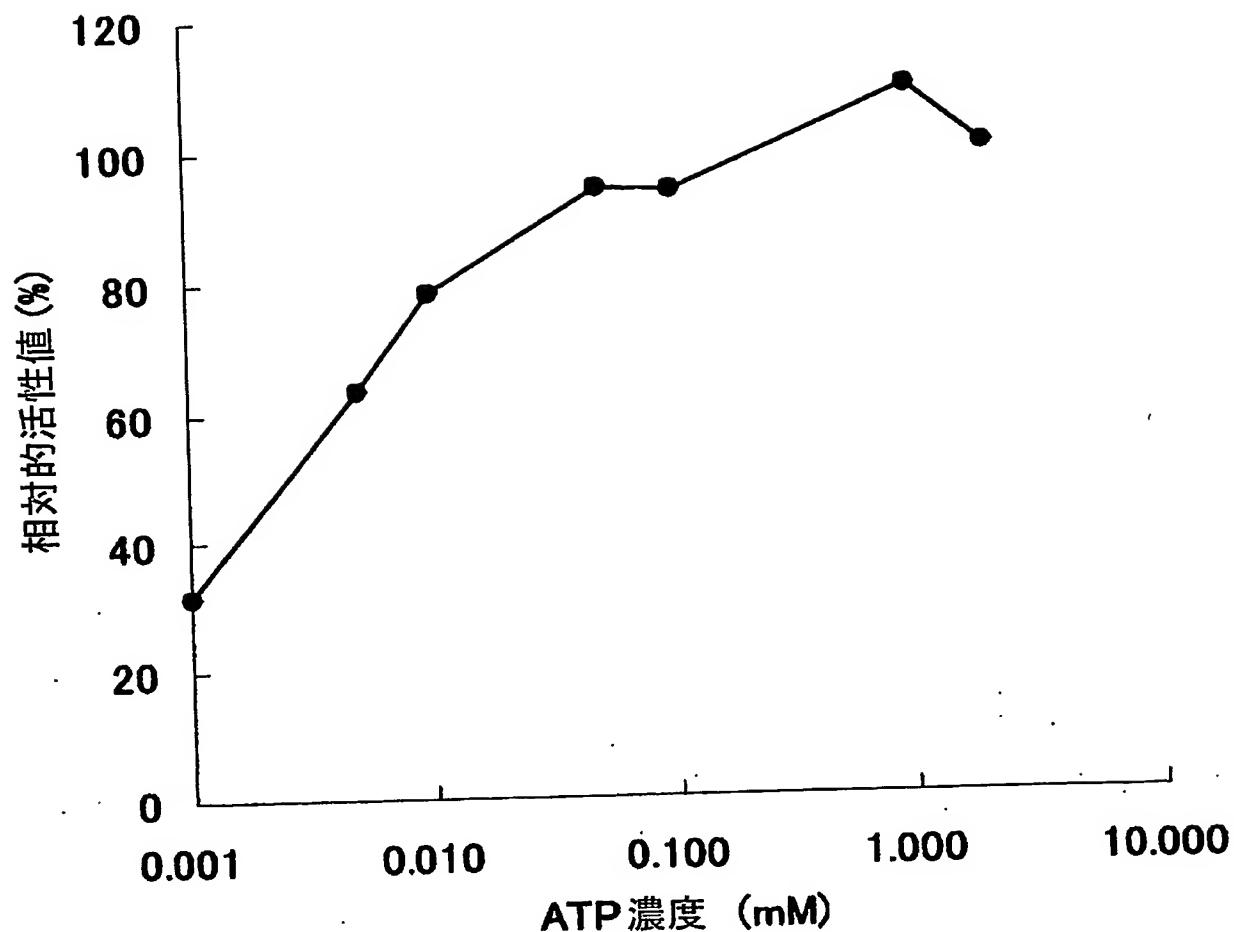


図 5

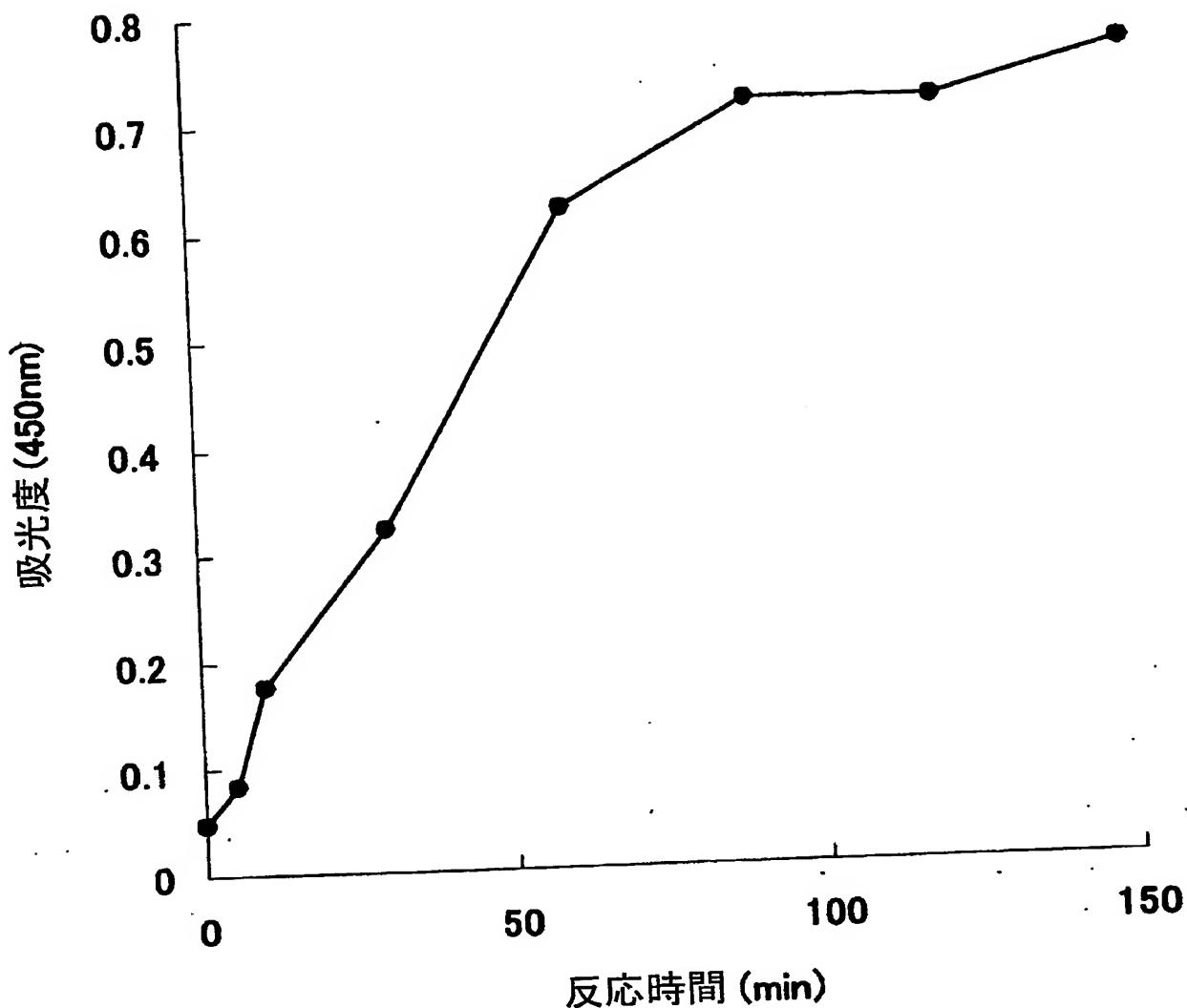


図 6

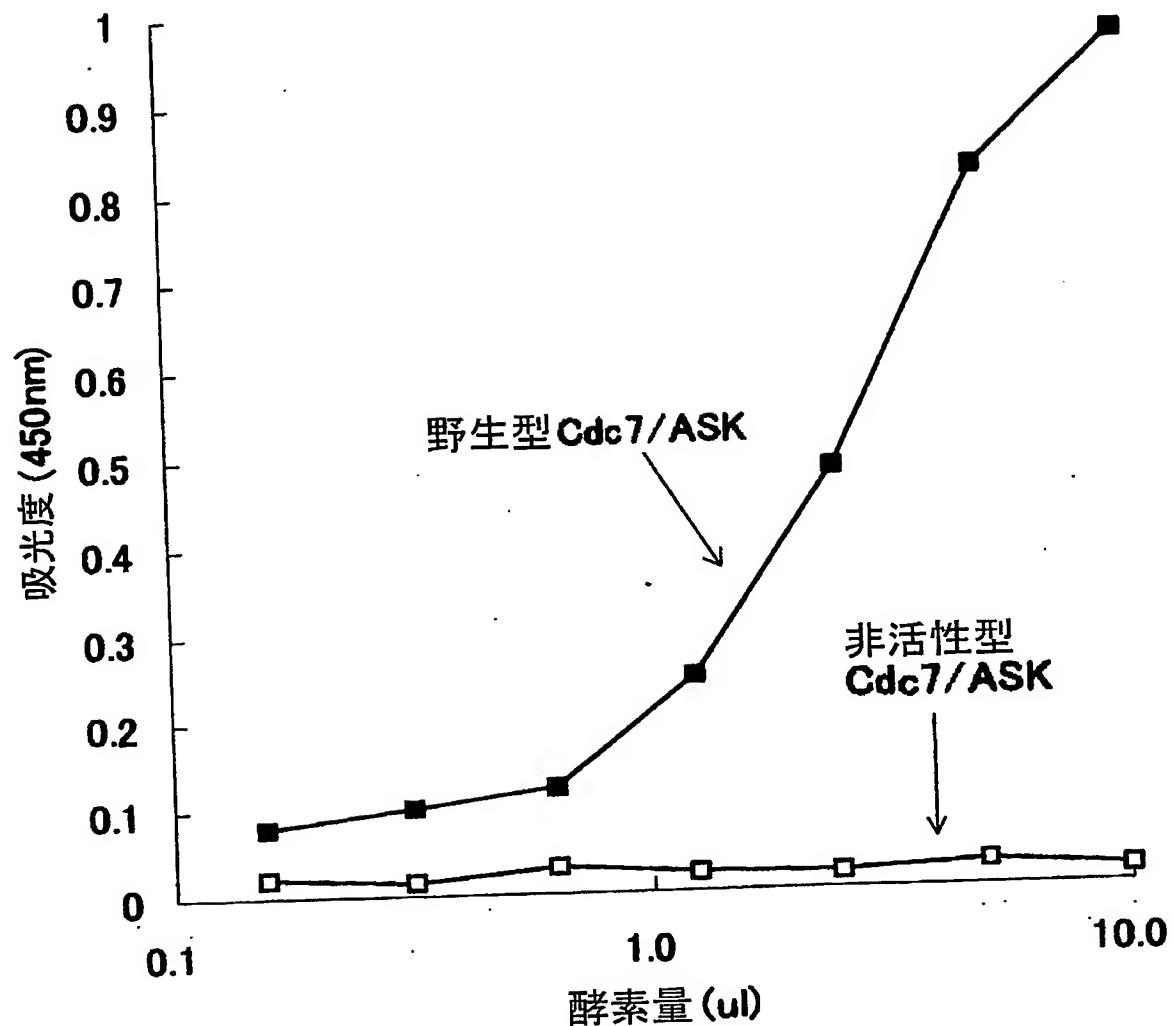


図 7

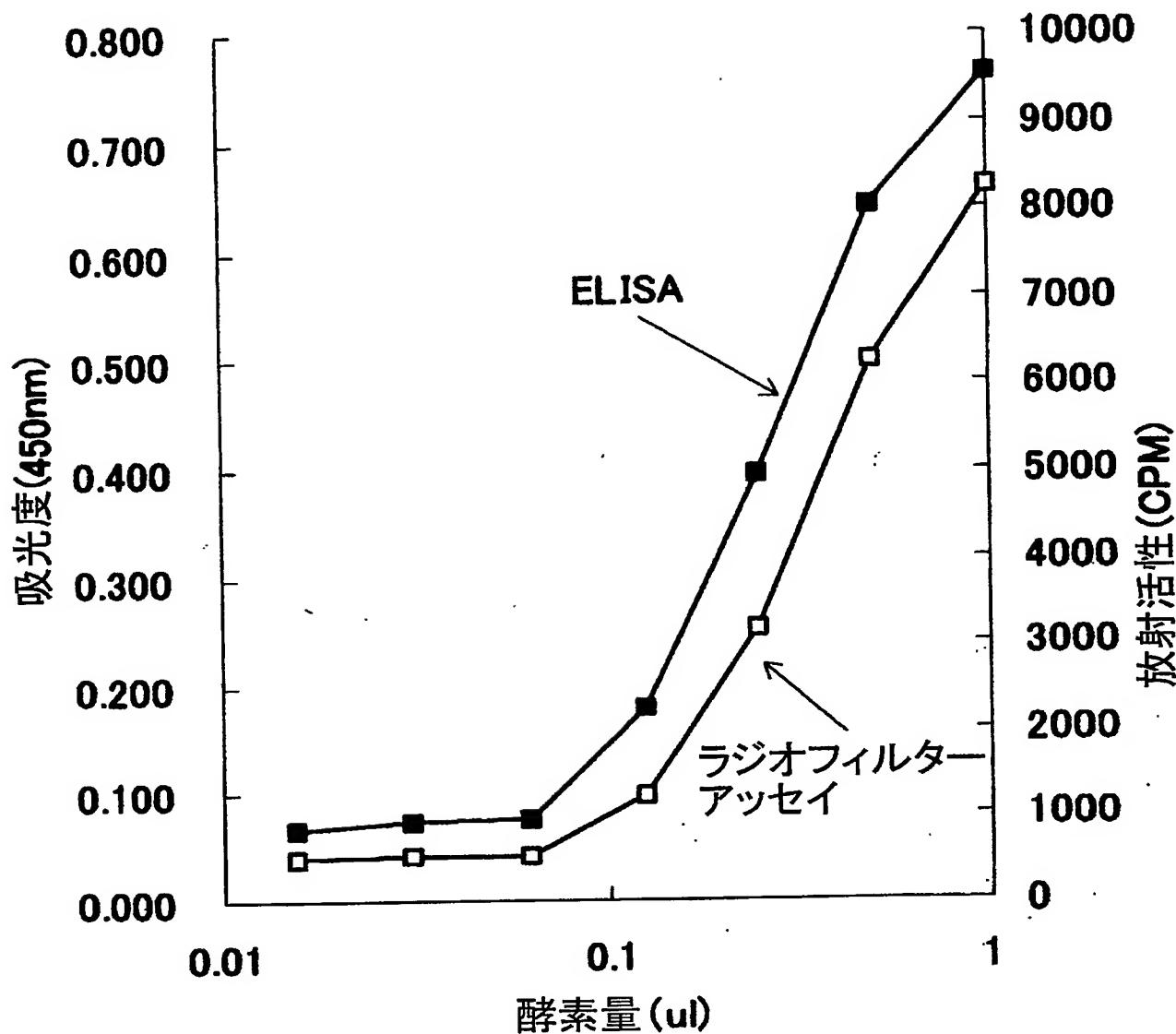
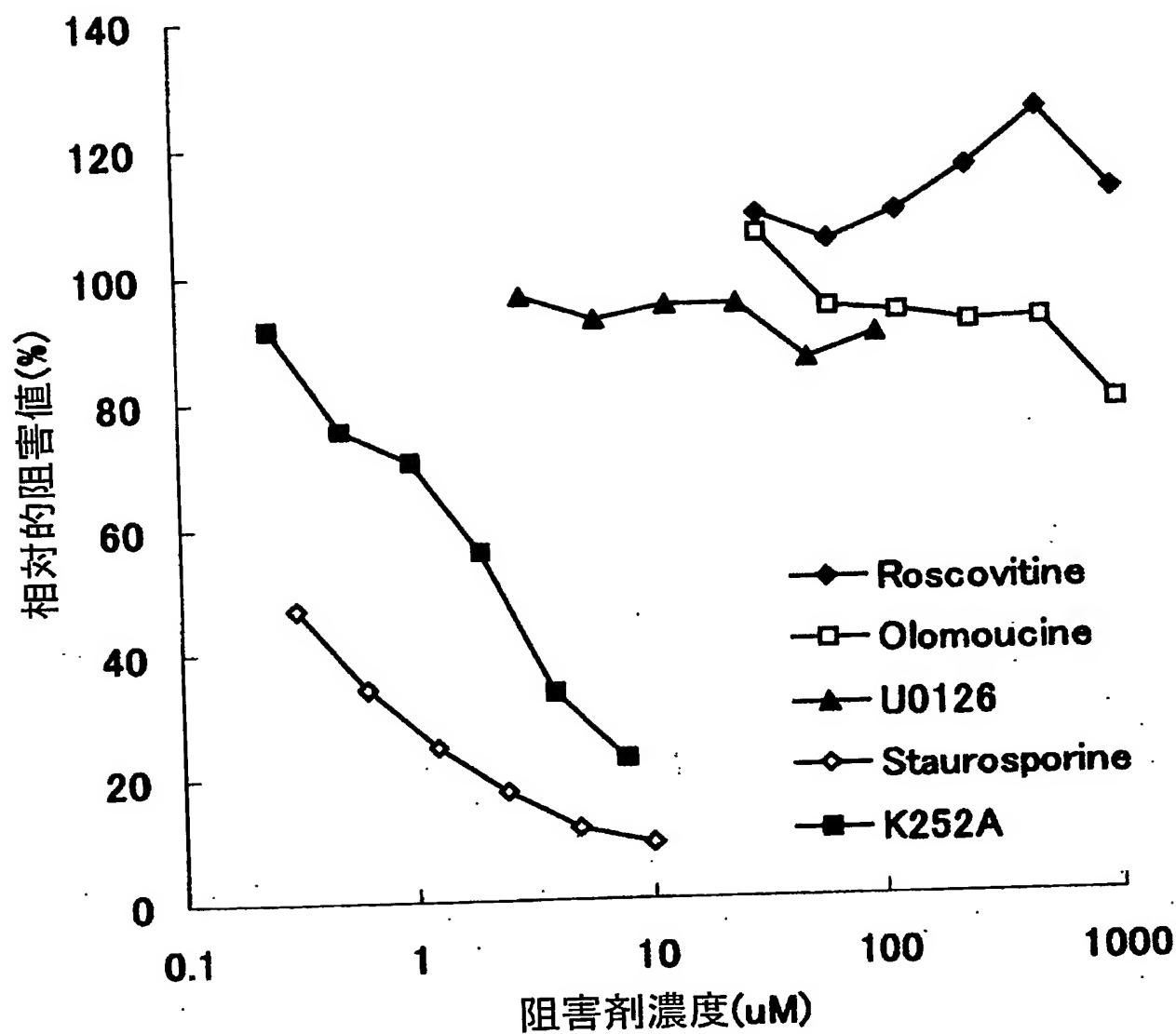


図 8



1 / 5 9

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

MASAI, Hisao

Medical and Biological Laboratories Co., Ltd.

<120> A Cdc7-ASK kinase complex, a substrate thereof, a specific antibody thereof, and a method for screening of a compound having the activity which inhibit the Cdc7-ASK kinase using them.

<130> M3-A0201P

<140>.

<141>

<150> JP 2002-067702

<151> 2002-03-12

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 130

<212> PRT

2 / 59

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr
1 5 10 15

Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser
20 25 30

Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu
35 40 45

Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile
50 55 60

Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala
65 70 75 80

Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu
85 90 95

Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala Ala Glu Arg Ala Met Arg Gln Arg Asp
100 105 110

Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr
115 120 125

3 / 5 9

Asp Ser

130

<210> 2

<211> 3379

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (31)..(2709)

<400> 2

aattccgcgg aatcatcgga atccttcacc atg gca tcc agc ccg gcc cag cgt 54
Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg

1

5

cgg cga ggc aat gat cct ctc acc tcc agc cct ggc cga agc tcc cgg 102
Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg

10

15

20

cgt act gat gcc ctc acc tcc agc cct ggc cgt gac ctt cca cca ttt 150
Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe

25

30

35

40

4 / 59

gag gat gag tcc gag ggg ctc cta ggc aca gag ggg ccc ctg gag gaa 198
gag gat gag tcc gag ggg ctc cta ggc aca gag ggg ccc ctg gag gaa 198
Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu
45 50 55

gaa gag gat gga gag gag ctc att gga gat ggc atg gaa agg gac tac 246
gaa gag gat gga gag gag ctc att gga gat ggc atg gaa agg gac tac 246
Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr
60 65 70

cgc gcc atc cca gag ctg gac gcc tat gag gcc gag gga ctg gct ctg 294
cgc gcc atc cca gag ctg gac gcc tat gag gcc gag gga ctg gct ctg 294
Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu
75 80 85

gat gat gag gac gta gag gag ctg acg gcc agt cga agg gag gca gca 342
gat gat gag gac gta gag gag ctg acg gcc agt cga agg gag gca gca 342
Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu Thr Ala Ser Arg Arg Glu Ala Ala
90 95 100

gac ggg cca tgc ggc acg gtg acc ggg agc tgg ccg ggg ctg ggc gca 390
gac ggg cca tgc ggc acg gtg acc ggg agc tgg ccg ggg ctg ggc gca 390
Asp Gly Pro Cys Gly Thr Val Thr Gly Ser Trp Pro Gly Leu Gly Ala
105 110 115 120

tgc gcc gtg ggc tcc tgt atg aca gcg atg agg agg acg agg agc gcc 438
tgc gcc gtg ggc tcc tgt atg aca gcg atg agg agg acg agg agc gcc 438
Cys Ala Val Gly Ser Cys Met Thr Ala Met Arg Arg Thr Arg Ser Ala
125 130 135

ctg ccc gca agc gcc gcc agt gga gcc ggc acg gag gac ggc gag gag 486
ctg ccc gca agc gcc gcc agt gga gcc ggc acg gag gac ggc gag gag 486

5 / 5 9

Leu Pro Ala Ser Ala Ala Ser Gly Ala Gly Thr Glu Asp Gly Glu Glu
140 145 150

gac gag cag atg att gag agc atc gag aac ctg gag gat ctc aaa ggc 534
gac gag cag atg att gag agc atc gag aac ctg gag gat ctc aaa ggc 534
Asp Glu Gln Met Ile Glu Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp Leu Lys Gly
155 160 165

cac tct gtg cgc gag tgg gtg agc atg gcg ggc ccc cgg ctg gag atc 582
cac tct gtg cgc gag tgg gtg agc atg gcg ggc ccc cgg ctg gag atc 582
His Ser Val Arg Glu Trp Val Ser Met Ala Gly Pro Arg Leu Glu Ile
170 175 180

cac cac cgc ttc aag aac ttc ctg cgc act cac gtc gac agc cac ggc 630
cac cac cgc ttc aag aac ttc ctg cgc act cac gtc gac agc cac ggc 630
His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu Arg Thr His Val Asp Ser His Gly
185 190 195 200

cac aac gtc ttc aag gag cgc atc agc gac atg tgc aaa gag aac cgt 678
cac aac gtc ttc aag gag cgc atc agc gac atg tgc aaa gag aac cgt 678
His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys Glu Asn Arg
205 210 215

gag agc ctg gtg gtg aac tat gag gac ttg gca gcc agg gag cac gtg 726
gag agc ctg gtg gtg aac tat gag gac ttg gca gcc agg gag cac gtg 726
Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg Glu His Val
220 225 230

ctg gcc tac ttc ctg cct gag gca ccg gcg gag ctg ctg cag atc ttt 774
ctg gcc tac ttc ctg cct gag gca ccg gcg gag ctg ctg cag atc ttt 774
Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu Gln Ile Phe
235 240 245

6 / 59

gat gag gct gcc ctg gag gtg gta ctg gcc atg tac ccc aag tac gac 822
Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val Leu Ala Met Tyr Pro Lys Tyr Asp

250 255 260

cgc atc acc aac cac atc cat gtc cgc atc tcc cac ctg cct ctg gtg 870
Arg Ile Thr Asn His Ile His Val Arg Ile Ser His Leu Pro Leu Val

265 270 275 280

gag gag ctg cgc tcg ctg agg cag ctg cat ctg aac cag ctg atc cgc 918
Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln Leu His Leu Asn Gln Leu Ile Arg

285 290 295

acc agt ggg gtg gtg acc agc tgc act ggc gtc ctg ccc cag ctc agc 966
Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro Gln Leu Ser

300 305 310

atg gtc aag tac aac tgc aac aag tgc aat ttc gtc ctg ggt cct ttc 1014
Met Val Lys Tyr Asn Cys Asn Lys Cys Asn Phe Val Leu Gly Pro Phe

315 320 325

tgc cag tcc cag aac cag gag gtg aaa cca ggc tcc tgt cct gag tgc 1062
Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys Pro Glu Cys

330 335 340

cag tcg gcc ggc ccc ttt gag gtc aac atg gag gag acc atc tat cag 1110

7 / 59

Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln
345 350 355 360

aac tac cag cgt atc cga atc cag gag agt cca ggc aaa gtg gcg gct 1158
Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys Val Ala Ala
365 370 375

cgg cgg ctg ccc cgc tcc aag gac gcc att ctc ctc gca gat ctg gtg 1206
Arg Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala Asp Leu Val
380 385 390

gac agc tgc aac gca gga gac gag ata gag ctg act ggc atc tat cac 1254
Asp Ser Cys Asn Ala Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly Ile Tyr His
395 400 405

aac aac tat gat ggc tcc ctc aac act gcc aat ggc ttc cct gtc ttt 1302
Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe Pro Val Phe
410 415 420

gcc act gtc atc cta gcc aac cac gtg gcc aag aag gac aac aag gtt 1350
Ala Thr Val Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp Asn Lys Val
425 430 435 440

gct gta ggg gaa ctg acc gat gaa gat gtg aag atg atc act agc ctc 1398
Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile Thr Ser Leu
445 450 455

8 / 59

tcc aag gat cag cag atc gga gag aag atc ttt gcc agc att gct cct 1446
Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser Ile Ala Pro
460 465 470

tcc atc tat ggt cat gaa gac atc aag aga ggc cct gct ctg gcc ctg 1494
Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Pro Ala Leu Ala Leu
475 480 485

ttc gga ggg gag ccc aaa aac cca ggt ggc aag cac aag gta cgt ggt 1542
Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys Val Arg Gly
490 495 500

gat atc aac gtg ctc ttg tgc gga gac cct ggc aca gct aag tcg cag 1590
Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala Lys Ser Gln
505 510 515 520

ttt ctc aag tat att gag aaa gtg tcc agc cga gcc atc ttc acc act 1638
Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile Phe Thr Thr
525 530 535

ggc cag ggg gcg tcg gct gtg gcc gtc acg gct tat gtc cag cgg cac 1686
Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Ala Val Thr Ala Tyr Val Gln Arg His
540 545 550

cct gtc agc agg gag tgg acc ttg gag gct ggg gcc ctg gtt ctg gct 1734

9 / 5 9

Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala

555

560

565

gac cga gga gtg tgt ctc att gat gaa ttt gac aag atg aat gac cag 1782

Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met Asn Asp Gln

570

575

580

gac aga acc agc atc cat gag gcc atg gag caa cag agc atc tcc atc 1830

Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser Ile Ser Ile

585

590

595

600

tcg aag gct ggc atc gtc acc tcc ctg cag gct cgc tgc acg gtc att 1878

Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys Thr Val Ile

605

610

615

gct gcc gcc aac ccc ata gga ggg cgc tac gac ccc tcg ctg act ttc 1926

Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Thr Phe

620

625

630

tct gag aac gtg gac ctc aca gag ccc atc atc tca cgc ttt gac atc 1974

Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg Phe Asp Ile

635

640

645

ctg tgt gtg gtg agg gac acc gtg gac cca gtc cag gac gag atg ctg 2022

Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val Asp Pro Val Gln Asp Glu Met Leu

650

655

660

10 / 59

gcc cgc ttc gtg gtg ggc agc cac gtc aga cac cac ccc agc aac aag 2070
Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His Val Arg His His Pro Ser Asn Lys
665 670 675 680

gag gag gag ggg ctg gcc aat ggc agc gct gct gag ccc gcc atg ccc 2118
Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asn Gly Ser Ala Ala Glu Pro Ala Met Pro
685 690 695

aac acg tat ggc gtg gag ccc ctg ccc cag gag gtc ctg aag aag tac 2166
Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu Lys Lys Tyr
700 705 710

atc atc tac gcc aag gag agg gtc cac ccg aag ctc aac cag atg gac 2214
Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val His Pro Lys Leu Asn Gln Met Asp
715 720 725

cag gac aag gtg gcc aag atg tac agt gac ctg agg aaa gaa tct atg 2262
Gln Asp Lys Val Ala Lys Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys Glu Ser Met
730 735 740

gcg aca ggc agc atc ccc att acg gtg cggt cac atc gag tcc atg agt 2310
Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr Val Arg His Ile Glu Ser Met Ser
745 750 755 760

cat ggc gga ggc cca cgc gcg cat cca tct gcg gga cta tgt gat cga 2358
cat ggc gga ggc cca cgc gcg cat cca tct gcg gga cta tgt gat cga

11/59

His Gly Gly Gly Pro Arg Ala His Pro Ser Ala Gly Leu Cys Asp Arg
765 770 775

aga cga cgt caa cat ggc cat ccg cgt gat gct gga gag ctt cat aga 2406
aga cga cgt caa cat ggc cat ccg cgt gat gct gga gag ctt cat aga
Arg Arg Arg Gln His Gly His Pro Arg Asp Ala Gly Glu Leu His Arg

780 785 790

cac aca gaa gtt cag cgt cat cgc agc atg cgc aag act ttt gcc cgc 2454
cac aca gaa gtt cag cgt cat cgc agc atg cgc aag act ttt gcc cgc
His Thr Glu Val Gln Arg His Arg Ser Met Arg Lys Thr Phe Ala Arg

795 800 805

tac ctt tca ttc cgg cgt gac aac aat gag ctg ttg ctc ttc ata ctg 2502
tac ctt tca ttc cgg cgt gac aac aat gag ctg ttg ctc ttc ata ctg
Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Glu Leu Leu Leu Phe Ile Leu

810 815 820

aag cag tta gtg gca gag cag gtg aca tat cag cgc aac cgc ttt ggg 2550
aag cag tta gtg gca gag cag gtg aca tat cag cgc aac cgc ttt ggg
Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg Asn Arg Phe Gly
825 830 835 840

gcc cag cag gac act att gag gtc cct gag aag gac ttg gtg gat aag 2598
gcc cag cag gac act att gag gtc cct gag aag gac ttg gtg gat aag
Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp Leu Val Asp Lys
845 850 855

gct cgt cag atc aac atc cac aac ctc tct gca ttt tat gac agt gag 2646
gct cgt cag atc aac atc cac aac ctc tct gca ttt tat gac agt gag
Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe Tyr Asp Ser Glu
860 865 870

12/59

ctc ttc agg atg aac aag ttc agc cac gac ctg aaa agg aaa atg atc 2694

Leu Phe Arg Met Asn Lys Phe Ser His Asp Leu Lys Arg Lys Met Ile

875

880

885

ctg cag cag ttc tga ggccctatgc catccataag gattccttgg gattctggtt 2749

Leu Gln Gln Phe

890

tgggggtggc agtgcctct gtgcattatg gacacaaaac cagagcactt gatgaactcg 2809

gggtactagg gtcaggcctt atagcaggat gtctggctgc acctggcatg actgtttgtt 2869

tctccaagcc tgctttgtgc ttctcacctt tgggtggat gccttgccag tgtgtcttac 2929

ttggttgtc aacatcttgc cacctccgag tgctttgtct ccactcagta cttggatca 2989

gagctgctga gttcaggatg cctgcgtgtg gtttaggtgt tagccttctt acatggatgt 3049

caggagagct gctgcctct tggcgtgagt tgcgtattca ggctgcttt gctcgcttg 3109

gccagagagc tggtaaga tggtaat cgtttcagt ctccgtcagg tttctgtgcc 3169

cctgtggtgg aagaggcacg acagtgccag cgacgcgttc tgggctcctc agtcgcaggg 3229

gtgggatgtg agtcatgcgg attatccact cgccacagtt atcagctgcc attgctccct 3289

gtctgtttcc ccactcttattgtcat tcggtttggt ttctgttagtt ttaattttta 3349

ataaaagtga ataaaaatata aaaaaaaaaa 3379

<210> 3

<211> 892

<212> PRT

<213> Homo sapiens

13/59

<400> 3

Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr
1 5 10 15

Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser
20 25 30

Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu
35 40 45

Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile
50 55 60

Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala
65 70 75 80

Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu
85 90 95

Thr Ala Ser Arg Arg Glu Ala Ala Asp Gly Pro Cys Gly Thr Val Thr
100 105 110

Gly Ser Trp Pro Gly Leu Gly Ala Cys Ala Val Gly Ser Cys Met Thr
115 120 125

Ala Met Arg Arg Thr Arg Ser Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Ala Gly Thr Glu Asp Gly Glu Glu Asp Glu Gln Met Ile Glu Ser Ile
145 150 155 160

Glu Asn Leu Glu Asp Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Trp Val Ser
165 170 175

Met Ala Gly Pro Arg Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu
180 185 190

1 4 / 5 9

Arg Thr His Val Asp Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile
195 200 205
Ser Asp Met Cys Lys Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu
210 215 220
Asp Leu Ala Ala Arg Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala
225 230 235 240
Pro Ala Glu Leu Leu Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val
245 250 255
Leu Ala Met Tyr Pro Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile His Val
260 265 270
Arg Ile Ser His Leu Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln
275 280 285
Leu His Leu Asn Gln Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys
290 295 300
Thr Gly Val Leu Pro Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys Asn Lys
305 310 315 320
Cys Asn Phe Val Leu Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val
325 330 335
Lys Pro Gly Ser Cys Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val
340 345 350
Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln
355 360 365
Glu Ser Pro Gly Lys Val Ala Ala Arg Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp
370 375 380
Ala Ile Leu Leu Ala Asp Leu Val Asp Ser Cys Asn Ala Gly Asp Glu
385 390 395 400

15/59

Ile Glu Leu Thr Gly Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn
405 410 415
Thr Ala Asn Gly Phe Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala Asn His
420 425 430
Val Ala Lys Lys Asp Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu
435 440 445
Asp Val Lys Met Ile Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu
450 455 460
Lys Ile Phe Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile
465 470 475 480
Lys Arg Gly Pro Ala Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro
485 490 495
Gly Gly Lys His Lys Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly
500 505 510
Asp Pro Gly Thr Ala Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val
515 520 525
Ser Ser Arg Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Ala
530 535 540
Val Thr Ala Tyr Val Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu
545 550 555 560
Glu Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp
565 570 575
Glu Phe Asp Lys Met Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala
580 585 590
Met Glu Gln Gln Ser Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser
595 600 605

16/59

Leu Gln Ala Arg Cys Thr Val Ile Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly
610 615 620
Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu
625 630 635 640
Pro Ile Ile Ser Arg Phe Asp Ile Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val
645 650 655
Asp Pro Val Gln Asp Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His
660 665 670
Val Arg His His Pro Ser Asn Lys Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asn Gly
675 680 685
Ser Ala Ala Glu Pro Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu
690 695 700
Pro Gln Glu Val Leu Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val
705 710 715 720
His Pro Lys Leu Asn Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Lys Met Tyr
725 730 735
Ser Asp Leu Arg Lys Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr
740 745 750
Val Arg His Ile Glu Ser Met Ser His Gly Gly Pro Arg Ala His
755 760 765
Pro Ser Ala Gly Leu Cys Asp Arg Arg Arg Arg Gln His Gly His Pro
770 775 780
Arg Asp Ala Gly Glu Leu His Arg His Thr Glu Val Gln Arg His Arg
785 790 795 800
Ser Met Arg Lys Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn
805 810 815

1 7 / 5 9

Asn Glu Leu Leu Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val

820 825

830

Thr Tyr Gln Arg Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Val

835 840

845

Pro Glu Lys Asp Leu Val Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn

850 855 860

Leu Ser Ala Phe Tyr Asp Ser Glu Leu Phe Arg Met Asn Lys Phe Ser

865 870 875 880

His Asp Leu Lys Arg Lys Met Ile Leu Gln Gln Phe

885 890

<210> 4

<211> 2715

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (2715)

<400> 4

atg gcg gag tct tct gag tct ctc tca gca tct agc cct gcc cgt cag 48

Met Ala Glu Ser Ser Glu Ser Leu Ser Ala Ser Ser Pro Ala Arg Gln

1

5

10

15

18 / 59

cg~~g~~ cg~~g~~ cg~~g~~ atc agt gat ccc ctc acc tcc agc cca ggc cg~~c~~ agc tcc 96
Arg Arg Arg Ile Ser Asp Pro Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser

20

25

30

ag~~a~~ cgt got gac gcc ctg acc tcc agc cct ggc aga gac ctc ccc cca 144
Arg Arg Ala Asp Ala Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro

35

40

45

ttt gaa gat gag tct gag ggg ctt ctg ggc aca gag ggg ccc atg gag 192
Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Pro Met Glu

50

55

60

gaa gaa gag gat gga gag gaa ctc att ggt gat ggc atg gag aga gac 240
Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp

65

70

75

80

tac cgt ccc att ccg gag ctc gat gtc tac gag gcc gag gga ttg gcc 288
Tyr Arg Pro Ile Pro Glu Leu Asp Val Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala

85

90

95

ctg gat gat gaa gat gtg gag gag ctg aca gcc agt cag aga gag gca 336
Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala

100

105

110

gct gag cgg acc atg agg cag cgg gac cgt gag gct ggc aga ggc ctg 384
Ala Glu Arg Thr Met Arg Gln Arg Asp Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu

1 9 / 5 9

115

120

125

gga cgc atg cgc cgg ggg ctg ctc tat gac agc agc gag gaa gat gag 432
Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr Asp Ser Ser Glu Glu Asp Glu

130

135

140

gag cgg cct gcc cgt aag cgc cgc cac gta gaa cgc gcc aca gag gat 480
Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg His Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp

145

150

155

160

ggc gag gag gat gaa gag atg atc gag agt att gag aat ctg gag gac 528
Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp

165

170

175

ctc aag ggc cac tcg gtg cgc gag cgg gtg agc atg gca ggg ccc agg 576
Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Arg Val Ser Met Ala Gly Pro Arg

180

185

190

ctg gag atc cac cac cgc ttc aag aac ttc ctg cgc acc cac gtg gac 624
Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu Arg Thr His Val Asp

195

200

205

agc cat ggc cac aac gtc ttc aag gag cgc atc agt gat atg tgc aaa 672
Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys

210

215

220

20 / 59

gag aac cgt gag agt ttg gtg gta aat tat gaa gac ctg gca gcc cgg 720
Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg

225 230 235 240

gag cac gtg ttg gca tac ttc ctg ccg gaa gca ccg gct gag ttg ctg 768
Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu

245 250 255

cag atc ttt gac gag gct gcc ctg gag gtc gtg ttg gcc atg tac cct 816
Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val Leu Ala Met Tyr Pro

260 265 270

aaa tat gac cgt atc acc aac cac atc cat gtg cgc atc tcc cac ctg 864
Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile His Val Arg Ile Ser His Leu

275 280 285

cct ctg gtg gag gag ctg cgt tca ctg agg cag ttg cac ctg aac cag 912
Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln Leu His Leu Asn Gln

290 295 300

ctg atc cgt acc agt ggc gtg gtg acc agc tgc acc gga gtc ctg ccc 960
Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro

305 310 315 320

cag ctc agc atg gtc aag tac aac tgt agc aag tgc aac ttt gta ctg 1008
Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys Ser Lys Cys Asn Phe Val Leu

21 / 59

325

330

335

ggg cct ttc tgc cag tct cag aat cag gag gtg aag cct ggc tcc tgc 1056
Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys

340

345

350

cct gag tgc cag tct gct ggg ccc ttt gag atc aac atg gag gag acc 1104
Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Ile Asn Met Glu Glu Thr

355

360

365

atc tat cag aac tac caa cgt atc cgc atc cag gag agt ccc ggc aag 1152
Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys

370

375

380

gtg gcg gct ggc cga ctg ccc cgt tcc aag gat gcc att ctc ctc gct 1200
Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala
385 390 395 400

gat ctg gtg gac agc tgc aag cca ggg gac gag att gag ctg acc ggc 1248
Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly
405 410 415

att tac cat aat aac tat gac ggc tcg ctt aac acc gcc aac ggc ttt 1296
Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe
420 425 430

22 / 59

cca gtc ttt gcc act att atc ttg gcc aac cat gtt gcc aag aag gac 1344
Pro Val Phe Ala Thr Ile Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp

435 440 445

aac aaa gta gct gtg ggg gag ctc acc gat gag gac gtg aag atg atc 1392
Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile

450 455 460

acc ggt ctc tcc aag gat cag caa att gga gag aag atc ttt gcc agc 1440
Thr Gly Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser
465 470 475 480

att gca ccc tcc atc tat ggg cat gaa gac atc aag aga ggc ctg gct 1488
Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala
485 490 495

ctg gcc ctg ttt gga ggg gag ccc aag aac cca ggt gga aag cac aag 1536
Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys
500 505 510

gtt cga ggt gac att aat gtg ctc ttg tgt ggg gac cct ggc aca gca 1584
Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala
515 520 525

aag tcc caa ttc ctc aaa tac atc gag aaa gtg tct agc cgt gcc atc 1632
Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile

23 / 59

530 535 540

ttc acc act ggc cag ggt gcg tca gca gtg ggt ctc acc gcg tac gtt 1680
Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val

545 550 555 560

cag cgg cat ccc gtc agc aga gag tgg acc tta gag gcg gga gcc ctg 1728
Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu

565 570 575

gtt ctg gct gac cgg ggg gtg tgt ctc att gac gag ttt gac aag atg 1776
Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met

580 585 590

aat gac cag gac agg acc agc atc cac gag gcc atg gaa cag caa agc 1824
Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser

595 600 605

atc tcc atc tcc aag gct ggc atc gtt acc tcg ctg caa gcc cgc tgc 1872
Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys

610 615 620

act gtc ata gct gct gcc aac ccc ata gga ggc cgc tac gac cct tca 1920
Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser

625 630 635 640

24/59

ctg acc ttc tca gag aat gta gac ctc aca gag ccc atc att tcc cgc 1968
Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg

645 650 655

ttt gat gtc ctg tgt gtg agg gac act gtt gat cca gtt cag gat 2016
Phe Asp Val Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val Asp Pro Val Gln Asp

660 665 670

gag atg ctg gcc cgc ttt gtg gtt ggc agc cac gtc aga cac cac ccc 2064
Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His Val Arg His His Pro

675 680 685

agt aac aag aag gat gaa ggg ttg act aat ggt ggc acc ttg gag cca 2112
Ser Asn Lys Lys Asp Glu Gly Leu Thr Asn Gly Gly Thr Leu Glu Pro

690 695 700

gcc atg ccc aac aca tat ggc gtg gag ccc ctg cct cag gag gtg ctg 2160
Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu
705 710 715 720

aag aag tat atc atc tat gcc aag gag agg gtc cgc ccg aag ctc aac 2208
Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val Arg Pro Lys Leu Asn
725 730 735

cag atg gac cag gat aaa gtg gcc agg atg tac agt gac ctg agg aag 2256
Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Arg Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys

25/59

740 745 750

gag tcc atg gca acg ggc agc att ccc atc acg gtg cgc cac atc gag 2304
Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr Val Arg His Ile Glu

755 760 765

tcc atg atc cgc atg gcc gag gcc cat gcc cgc atg cac ctg cgg gac 2352
Ser Met Ile Arg Met Ala Glu Ala His Ala Arg Met His Leu Arg Asp

770 775 780

tac gtg atg gaa gac gat gtc aac atg gcc atc cga gtg atg atg gag 2400
Tyr Val Met Glu Asp Asp Val Asn Met Ala Ile Arg Val Met Met Glu
785 790 795 800agc ttc att gac acc cag aag ttc agc gtc atg cgg agt atg cgc aag 2448
Ser Phe Ile Asp Thr Gln Lys Phe Ser Val Met Arg Ser Met Arg Lys
805 810 815act ttt gcc cgg tat ctc tcc ttc cgg cga gat aac aat gat ctg ctg 2496
Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Asp Leu Leu
820 825 830ctc ttc ata ctg aag cag ttg gtg gct gag cag gtg aca tat caa cgc 2544
Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg
835 840 845

26 / 59

aac cgc ttt ggg gcc cag cag gac acc att gaa ata cct gag aag gat 2592
Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Ile Pro Glu Lys Asp

850 855 860

ctg atg gac aag gcc agg cag atc aat att cac aac ctc tct gcc ttc 2640
Leu Met Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe
865 870 875 880

tac gac agc gac ctc ttc aaa ttc aac aag ttc agc cgt gac ctg aaa 2688
Tyr Asp Ser Asp Leu Phe Lys Phe Asn Lys Phe Ser Arg Asp Leu Lys
885 890 895

cgc aaa ctg atc cta cag cag ttc tga 2715
Arg Lys Leu Ile Leu Gln Gln Phe
900 905

<210> 5

<211> 904

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 5

Met Ala Glu Ser Ser Glu Ser Leu Ser Ala Ser Ser Pro Ala Arg Gln

1

5

10

15

Arg Arg Arg Ile Ser Asp Pro Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser

27 / 59

20 25 30
Arg Arg Ala Asp Ala Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro
35 40 45
Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Pro Met Glu
50 55 60
Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp
65 70 75 80
Tyr Arg Pro Ile Pro Glu Leu Asp Val Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala
85 90 95
Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala
100 105 110
Ala Glu Arg Thr Met Arg Gln Arg Asp Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu
115 120 125
Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr Asp Ser Ser Glu Glu Asp Glu
130 135 140
Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg His Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp
145 150 155 160
Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp
165 170 175
Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Arg Val Ser Met Ala Gly Pro Arg
180 185 190
Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu Arg Thr His Val Asp
195 200 205
Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys
210 215 220
Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg

28 / 59

225 230 235 240
Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu
245 250 255
Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val Leu Ala Met Tyr Pro
260 265 270
Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile His Val Arg Ile Ser His Leu
275 280 285
Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln Leu His Leu Asn Gln
290 295 300
Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro
305 310 315 320
Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys Ser Lys Cys Asn Phe Val Leu
325 330 335
Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys
340 345 350
Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Ile Asn Met Glu Glu Thr
355 360 365
Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys
370 375 380
Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala
385 390 395 400
Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly
405 410 415
Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe
420 425 430
Pro Val Phe Ala Thr Ile Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp

29 / 59

435 440 445
Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile
450 455 460
Thr Gly Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser
465 470 475 480
Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala
485 490 495
Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys
500 505 510
Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala
515 520 525
Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile
530 535 540
Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val
545 550 555 560
Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu
565 570 575
Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met
580 585 590
Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser
595 600 605
Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys
610 615 620
Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser
625 630 635 640
Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg

30 / 59

645 650 655
Phe Asp Val Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val Asp Pro Val Gln Asp
660 665 670
Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His Val Arg His His Pro
675 680 685
Ser Asn Lys Lys Asp Glu Gly Leu Thr Asn Gly Gly Thr Leu Glu Pro
690 695 700
Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu
705 710 715 720
Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val Arg Pro Lys Leu Asn
725 730 735
Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Arg Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys
740 745 750
Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr Val Arg His Ile Glu
755 760 765
Ser Met Ile Arg Met Ala Glu Ala His Ala Arg Met His Leu Arg Asp
770 775 780
Tyr Val Met Glu Asp Asp Val Asn Met Ala Ile Arg Val Met Met Glu
785 790 795 800
Ser Phe Ile Asp Thr Gln Lys Phe Ser Val Met Arg Ser Met Arg Lys
805 810 815
Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Asp Leu Leu
820 825 830
Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg
835 840 845
Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Ile Pro Glu Lys Asp

31 / 59

850 855 860
Leu Met Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe
865 870 875 880
Tyr Asp Ser Asp Leu Phe Lys Phe Asn Lys Phe Ser Arg Asp Leu Lys
885 890 895
Arg Lys Leu Ile Leu Gln Gln Phe
900

<210> 6

<211> 3187

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (133)..(1857)

<400> 6

gaattcggca cgagttggag acggcgaccc aggcacatctgg ggagcacaga agtcgtactc 60
ccttaaaccc tgctttgctc cccctgtgga tgtaaccct tagctggcat tttgcacatc 120

aattggcttg tg atg gag gcg tct ttg ggg att cag atg gat gag cca atg 171
Met Glu Ala Ser Leu Gly Ile Gln Met Asp Glu Pro Met

32/59

gct ttt tct ccc cag cgt gac cgg ttt cag gct gaa ggc tct tta aaa 219
Ala Phe Ser Pro Gln Arg Asp Arg Phe Gln Ala Glu Gly Ser Leu Lys

15

20

25

aaa aac gag cag aat ttt aaa ctt gca ggt gtt aaa aaa gat att gag 267
Lys Asn Glu Gln Asn Phe Lys Leu Ala Gly Val Lys Lys Asp Ile Glu
30 35 40 45

aag ctt tat gaa gct gta cca cag ctt agt aat gtg ttt aag att gag 315
Lys Leu Tyr Glu Ala Val Pro Gln Leu Ser Asn Val Phe Lys Ile Glu
50 55 60

gac aaa att gga gaa ggc act ttc agc tct gtt tat ttg gcc aca gca 363
Asp Lys Ile Gly Glu Gly Thr Phe Ser Ser Val Tyr Leu Ala Thr Ala
65 70 75

cag tta caa gta gga cct gaa gag aaa att gct cta aaa cac ttg att 411
Gln Leu Gln Val Gly Pro Glu Glu Lys Ile Ala Leu Lys His Leu Ile
80 85 90

cca aca agt cat cct ata aga att gca gct gaa ctt cag tgc cta aca 459
Pro Thr Ser His Pro Ile Arg Ile Ala Ala Glu Leu Gln Cys Leu Thr
95 100 105

gtg gct ggg ggg caa gat aat gtc atg gga gtt aaa tac tgc ttt agg 507
Val Ala Gly Gly Gln Asp Asn Val Met Gly Val Lys Tyr Cys Phe Arg

33/59

110 115 120 125
aag aat gat cat gta gtt att gct atg cca tat ctg gag cat gag tcg 555
Lys Asn Asp His Val Val Ile Ala Met Pro Tyr Leu Glu His Glu Ser
130 135 140
ttt ttg gac att ctg aat tct ctt tcc ttt caa gaa gta cgg gaa tat 603
Phe Leu Asp Ile Leu Asn Ser Leu Ser Phe Gln Glu Val Arg Glu Tyr
145 150 155
atg ctt aat ctg ttc aaa gct ttg aaa cgc att cat cag ttt ggt att 651
Met Leu Asn Leu Phe Lys Ala Leu Lys Arg Ile His Gln Phe Gly Ile
160 165 170
gtt cac cgt gat gtt aag ccc agc aat ttt tta tat aat agg cgc ctg 699
Val His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Phe Leu Tyr Asn Arg Arg Leu
175 180 185
aaa aag tat gcc ttg gta gac ttt ggt ttg gcc caa gga acc cat gat 747
Lys Lys Tyr Ala Leu Val Asp Phe Gly Leu Ala Gln Gly Thr His Asp
190 195 200 205
acg aaa ata gag ctt ctt aaa ttt gtc cag tct gaa gct cag cag gaa 795
Thr Lys Ile Glu Leu Leu Lys Phe Val Gln Ser Glu Ala Gln Gln Glu
210 215 220

34 / 59

agg tgt tca caa aac aaa tcc cac ata atc aca gga aac aag att cca 843
Arg Cys Ser Gln Asn Lys Ser His Ile Ile Thr Gly Asn Lys Ile Pro
225 230 235

ctg agt ggc cca gta cct aag gag ctg gat cag cag tcc acc aca aaa 891
Leu Ser Gly Pro Val Pro Lys Glu Leu Asp Gln Gln Ser Thr Thr Lys
240 245 250

gct tct gtt aaa aga ccc tac aca aat gca caa att cag att aaa caa 939
Ala Ser Val Lys Arg Pro Tyr Thr Asn Ala Gln Ile Gln Ile Lys Gln
255 260 265

gga aaa gac gga aag gag gga tct gta ggc ctt tct gtc cag cgc tct 987
Gly Lys Asp Gly Lys Glu Gly Ser Val Gly Leu Ser Val Gln Arg Ser
270 275 280 285

gtt ttt gga gaa aga aat ttc aat ata cac agc tcc att tca cat gag 1035
Val Phe Gly Glu Arg Asn Phe Asn Ile His Ser Ser Ile Ser His Glu
290 295 300

agc cct gca gtg aaa ctc atg aag cag tca aag act gtg gat gta ctg 1083
Ser Pro Ala Val Lys Leu Met Lys Gln Ser Lys Thr Val Asp Val Leu
305 310 315

tct aga aag tta gca aca aaa aag aag gct att tct acg aaa gtt atg 1131
Ser Arg Lys Leu Ala Thr Lys Lys Ala Ile Ser Thr Lys Val Met

35/59

320

325

330

aat agt gct gtg atg agg aaa act gcc agt tct tgc cca gct agc ctg 1179
Asn Ser Ala Val Met Arg Lys Thr Ala Ser Ser Cys Pro Ala Ser Leu

335

340

345

acc tgt gac tgc tat gca aca gat aaa gtt tgt agt att tgc ctt tca 1227
Thr Cys Asp Cys Tyr Ala Thr Asp Lys Val Cys Ser Ile Cys Leu Ser

350

355

360

365

agg cgt cag cag gtt gcc cct agg gca ggt aca cca gga ttc aga gca 1275
Arg Arg Gln Gln Val Ala Pro Arg Ala Gly Thr Pro Gly Phe Arg Ala

370

375

380

cca gag gtc ttg aca aag tgc ccc aat caa act aca gca att gac atg 1323
Pro Glu Val Leu Thr Lys Cys Pro Asn Gln Thr Thr Ala Ile Asp Met

385

390

395

tgg tct gca ggt gtc ata ttt ctt tct ttg ctt agt gga cga tat cca 1371
Trp Ser Ala Gly Val Ile Phe Leu Ser Leu Leu Ser Gly Arg Tyr Pro

400

405

410

ttt tat aaa gca agt gat gat tta act gct ttg gcc caa att atg aca 1419
Phe Tyr Lys Ala Ser Asp Asp Leu Thr Ala Leu Ala Gln Ile Met Thr

415

420

425

36 / 59

att agg gga tcc aga gaa act atc caa gct gct aaa act ttt ggg aaa 1467
Ile Arg Gly Ser Arg Glu Thr Ile Gln Ala Ala Lys Thr Phe Gly Lys
430 435 440 445

tca ata tta tgt agc aaa gaa gtt cca gca caa gac ttg aga aaa ctc 1515
Ser Ile Leu Cys Ser Lys Glu Val Pro Ala Gln Asp Leu Arg Lys Leu
450 455 460

tgt gag aga ctc agg ggt atg gat tct agc act ccc aag tta aca agt 1563
Cys Glu Arg Leu Arg Gly Met Asp Ser Ser Thr Pro Lys Leu Thr Ser
465 470 475

gat ata caa ggg cat gct tct cat caa cca gct att tca gag aag act 1611
Asp Ile Gln Gly His Ala Ser His Gln Pro Ala Ile Ser Glu Lys Thr
480 485 490

gac cat aaa gct tct tgc ctc gtt caa aca cct cca gga caa tac tca 1659
Asp His Lys Ala Ser Cys Leu Val Gln Thr Pro Pro Gly Gln Tyr Ser
495 500 505

ggg aat tca ttt aaa aag ggg gat agt aat agc tgt gag cat tgt ttt 1707
Gly Asn Ser Phe Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Cys Glu His Cys Phe
510 515 520 525

gat gag tat aat acc aat tta gaa ggc tgg aat gag gta cct gat gaa 1755
Asp Glu Tyr Asn Thr Asn Leu Glu Gly Trp Asn Glu Val Pro Asp Glu

37/59

530 535 540

gct tat gac ctg ctt gat aaa ctt cta gat cta aat cca gct tca aga 1803
Ala Tyr Asp Leu Leu Asp Lys Leu Leu Asp Leu Asn Pro Ala Ser Arg

545 550 555

ata aca gca gaa gaa gct ttg ttg cat cca ttt ttt aaa gat atg agc 1851
Ile Thr Ala Glu Glu Ala Leu Leu His Pro Phe Phe Lys Asp Met Ser

560 565 570

ttg tga taatggatct tcatttaatg tttactgtta tgaggttagaa taaaaaagaa 1907
Leu

575

tactttgtaa tagccacaag ttcttgtta gagaccagag caggattaat aatttatttt 1967
aacatttttag tgtttggtgg cacattctaa aatatacgatt aagaatactt aaaatgcctg 2027
ggatagttct tgggactaac aacatgatct tccttgagtt aaacctacct aagtagattt 2087
taggtgggtt cctatttaggt cagattttta gcttcctaa ttaccttca ctgacatata 2147
cagaaaaagg agcagttta gtttaatttta attaaaatttta acagatgtga tgaggattaa 2207
atgaatcaaa agacttaatt ttagattct ttagagttt tgagcttaggt atagtttggg 2267
gaaactcaac ctggtgctgg tgctcttaac aattttgtaa ataaagaaga taatttcctt 2327
ttcttagaggt acatattagg ccttttatga acactaaaac aatgagggaaa tggtggcat 2387
ggggcaaaagt atcacttaaa attgaattca tccattttta aaaaacactt catgaaagca 2447
ttctgggtgtg aattgccatt ttttcttac tggcttctca atttcttcc ttctctgccc 2507
ctacctaaaa cattctcctc ggaaattaca tggtgctgac cacaagttt ctggatgttt 2567
tattaaatat ttagtacgtctt tacagttggg aattttaaaat aatacataca ctggttgata 2627

38 / 59

aagggaagct gcaggaccaa ggtgaagatt gatagtccaa atgctttct ttttgagtt 2687
gtatattttt ggacaccatc ttagatataa ttaggttagct gctgaaagga aaagtgaata 2747
cagaattgac ggtattattg gagattttc ctctgcgtag agccatccag atctctgtat 2807
cctgtttga ctaagtctta ggtgggttg gaagacagat aatgaagtgt aggcaaagag 2867
aaaaggaccc aagatagagg tttatattca gaaatggtat atatcaatga cagcatatca 2927
aacttcctat gggaaaaagt ctggtggttg gtcagctgac agatttccca ttttagtagtc 2987
atagaataca gaaatagttt agggacatgt attcattttg ttatttgag cattgatagg 3047
tcagtatatc tacctaattct gtttgtaag tataggatataaaaccattt accattgatc 3107
tgtcttatgc cataatctta aaaaaaaatt gaatgctttt gaatttgtat attcaataaa 3167
gttatccttt tatattttt 3187

<210> 7

<211> 574

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu Ala Ser Leu Gly Ile Gln Met Asp Glu Pro Met Ala Phe Ser

1

5

10

15

Pro Gln Arg Asp Arg Phe Gln Ala Glu Gly Ser Leu Lys Lys Asn Glu

20

25

30

Gln Asn Phe Lys Leu Ala Gly Val Lys Lys Asp Ile Glu Lys Leu Tyr

35

40

45

Glu Ala Val Pro Gln Leu Ser Asn Val Phe Lys Ile Glu Asp Lys Ile

50

55

60

39/59

Gly Glu Gly Thr Phe Ser Ser Val Tyr Leu Ala Thr Ala Gln Leu Gln
65 70 75 80
Val Gly Pro Glu Glu Lys Ile Ala Leu Lys His Leu Ile Pro Thr Ser
85 90 95
His Pro Ile Arg Ile Ala Ala Glu Leu Gln Cys Leu Thr Val Ala Gly
100 105 110
Gly Gln Asp Asn Val Met Gly Val Lys Tyr Cys Phe Arg Lys Asn Asp
115 120 125
His Val Val Ile Ala Met Pro Tyr Leu Glu His Glu Ser Phe Leu Asp
130 135 140
Ile Leu Asn Ser Leu Ser Phe Gln Glu Val Arg Glu Tyr Met Leu Asn
145 150 155 160
Leu Phe Lys Ala Leu Lys Arg Ile His Gln Phe Gly Ile Val His Arg
165 170 175
Asp Val Lys Pro Ser Asn Phe Leu Tyr Asn Arg Arg Leu Lys Lys Tyr
180 185 190
Ala Leu Val Asp Phe Gly Leu Ala Gln Gly Thr His Asp Thr Lys Ile
195 200 205
Glu Leu Leu Lys Phe Val Gln Ser Glu Ala Gln Gln Glu Arg Cys Ser
210 215 220
Gln Asn Lys Ser His Ile Ile Thr Gly Asn Lys Ile Pro Leu Ser Gly
225 230 235 240
Pro Val Pro Lys Glu Leu Asp Gln Gln Ser Thr Thr Lys Ala Ser Val
245 250 255
Lys Arg Pro Tyr Thr Asn Ala Gln Ile Gln Ile Lys Gln Gly Lys Asp
260 265 270

40 / 59

Gly Lys Glu Gly Ser Val Gly Leu Ser Val Gln Arg Ser Val Phe Gly
275 280 285
Glu Arg Asn Phe Asn Ile His Ser Ser Ile Ser His Glu Ser Pro Ala
290 295 300
Val Lys Leu Met Lys Gln Ser Lys Thr Val Asp Val Leu Ser Arg Lys
305 310 315 320
Leu Ala Thr Lys Lys Ala Ile Ser Thr Lys Val Met Asn Ser Ala
325 330 335
Val Met Arg Lys Thr Ala Ser Ser Cys Pro Ala Ser Leu Thr Cys Asp
340 345 350
Cys Tyr Ala Thr Asp Lys Val Cys Ser Ile Cys Leu Ser Arg Arg Gln
355 360 365
Gln Val Ala Pro Arg Ala Gly Thr Pro Gly Phe Arg Ala Pro Glu Val
370 375 380
Leu Thr Lys Cys Pro Asn Gln Thr Thr Ala Ile Asp Met Trp Ser Ala
385 390 395 400
Gly Val Ile Phe Leu Ser Leu Leu Ser Gly Arg Tyr Pro Phe Tyr Lys
405 410 415
Ala Ser Asp Asp Leu Thr Ala Leu Ala Gln Ile Met Thr Ile Arg Gly
420 425 430
Ser Arg Glu Thr Ile Gln Ala Ala Lys Thr Phe Gly Lys Ser Ile Leu
435 440 445
Cys Ser Lys Glu Val Pro Ala Gln Asp Leu Arg Lys Leu Cys Glu Arg
450 455 460
Leu Arg Gly Met Asp Ser Ser Thr Pro Lys Leu Thr Ser Asp Ile Gln
465 470 475 480

41 / 59

Gly His Ala Ser His Gln Pro Ala Ile Ser Glu Lys Thr Asp His Lys
485 490 495
Ala Ser Cys Leu Val Gln Thr Pro Pro Gly Gln Tyr Ser Gly Asn Ser
500 505 510
Phe Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Cys Glu His Cys Phe Asp Glu Tyr
515 520 525
Asn Thr Asn Leu Glu Gly Trp Asn Glu Val Pro Asp Glu Ala Tyr Asp
530 535 540
Leu Leu Asp Lys Leu Leu Asp Leu Asn Pro Ala Ser Arg Ile Thr Ala
545 550 555 560
Glu Glu Ala Leu Leu His Pro Phe Phe Lys Asp Met Ser Leu
565 570

<210> 8

<211> 2780

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (518)..(2542)

<400> 8

aattcggcac gagctctctg aggctgcgcc aagacctgaa gcggcggacc gagagccgg 60
gtctgagact gagagagcaa cggaatggag gcggggtaga ggccggaaaca caacctgcag 120

42 / 59

ggccagagcg aggcgcgaga aggacggcgg cgtgaggggg cggggcgccg agcgcgagaa 180
ggcaggcacg agggcgagc gcgaggcggg gcacggcgacg tggcgtgaga cggggcgggg 240
cgcgctatc ggcgcgcgg ccgcgtgacg cgtttcaaa tcttcaaccg ccgcagccca 300
ctcgttgtg ctttgcgcct tccttcctcg cgccttggag ccggatccgg ccccgaaac 360
ccgacactgca gacgcgtac ctctactgac tagaggccgt agctggcgga aggagagagg 420
cggccgtcct gtcaacaggc cgggggaagc cgtgcttcg cggctgcccgtgcgacact 480

ttctccggac ccagcatgta ggtgccggc gactgcc atg aac tcc gga gcc atg 535
Met Asn Ser Gly Ala Met

1 5

agg atc cac agt aaa gga cat ttc cag ggt gga atc caa gtc aaa aat 583
Arg Ile His Ser Lys Gly His Phe Gln Gly Gly Ile Gln Val Lys Asn
10 15 20

gaa aaa aac aga cca tct ctg aaa tct ctg aaa act gat aac agg cca 631
Glu Lys Asn Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu Lys Thr Asp Asn Arg Pro
25 30 35

gaa aaa tcc aaa tgt aag cca ctt tgg gga aaa gta ttt tac ctt gac 679
Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly Lys Val Phe Tyr Leu Asp
40 45 50

tta cct tct gtc acc ata tct gaa aaa ctt caa aag gac att aag gat 727
Leu Pro Ser Val Thr Ile Ser Glu Lys Leu Gln Lys Asp Ile Lys Asp
55 60 65 70

43 / 59

ctg gga ggg cga gtt gaa gaa ttt ctc agc aaa gat atc agt tat ctt 775
Leu Gly Gly Arg Val Glu Glu Phe Leu Ser Lys Asp Ile Ser Tyr Leu

75

80

85

att tca aat aag aag gaa gct aaa ttt gca caa acc ttg ggt cga att 823
Ile Ser Asn Lys Lys Glu Ala Lys Phe Ala Gln Thr Leu Gly Arg Ile

90

95

100

tct cct gta cca agt cca gaa tct gca tat act gca gaa acc act tca 871
Ser Pro Val Pro Ser Pro Glu Ser Ala Tyr Thr Ala Glu Thr Thr Ser

105

110

115

cct cat ccc agc cat gat gga agt tca ttt aag tca cca gac aca gtg 919
Pro His Pro Ser His Asp Gly Ser Ser Phe Lys Ser Pro Asp Thr Val

120

125

130

tgt tta agc aga gga aaa tta tta gtt gaa aaa gct atc aag gac cat 967
Cys Leu Ser Arg Gly Lys Leu Leu Val Glu Lys Ala Ile Lys Asp His
135 140 145 150

gat ttt att cct tca aat agt ata tta tca aat gcc ttg tca tgg gga 1015
Asp Phe Ile Pro Ser Asn Ser Ile Leu Ser Asn Ala Leu Ser Trp Gly
155 160 165

gta aaa att ctt cat att gat gac att aga tac tac att gaa caa aag 1063

4 4 / 5 9

Val Lys Ile Leu His Ile Asp Asp Ile Arg Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys

170

175

180

aaa aaa gag ttg tat tta ctc aag aaa tca agt act tca gta aga gat 1111
Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Lys Ser Ser Thr Ser Val Arg Asp

185

190

195

ggg ggc aaa aga gtt agt ggt gca caa aaa aca aga aca gga aga 1159
Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser Gly Ala Gln Lys Thr Arg Thr Gly Arg

200

205

210

ctc aaa aag cct ttt gta aag gtg gaa gat atg agc caa ctt tat agg 1207
Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys Val Glu Asp Met Ser Gln Leu Tyr Arg

215

220

225

230

cca ttt tat ctt cag ctg acc aat atg cct ttt ata aat tat tct att 1255
Pro Phe Tyr Leu Gln Leu Thr Asn Met Pro Phe Ile Asn Tyr Ser Ile

235

240

245

cag aag ccc tgc agt cca ttt gat gta gac aag cca tct agt atg caa 1303
Gln Lys Pro Cys Ser Pro Phe Asp Val Asp Lys Pro Ser Ser Met Gln

250

255

260

aag caa act cag gtt aaa cta aga atc caa aca gat ggc gat aag tat 1351
Lys Gln Thr Gln Val Lys Leu Arg Ile Gln Thr Asp Gly Asp Lys Tyr

265

270

275

45/59

ggt gga acc tca att caa ctc cag ttg aaa gag aag aag aaa aaa gga 1399
Gly Gly Thr Ser Ile Gln Leu Gln Leu Lys Glu Lys Lys Lys Gly
280 285 290

tat tgt gaa tgt tgc ttg cag aaa tat gaa gat cta gaa act cac ctt 1447
Tyr Cys Glu Cys Cys Leu Gln Lys Tyr Glu Asp Leu Glu Thr His Leu
295 300 305 310

cta agt gag caa cac aga aac ttt gca cag agt aac cag tat caa gtt 1495
Leu Ser Glu Gln His Arg Asn Phe Ala Gln Ser Asn Gln Tyr Gln Val
315 320 325

gtt gat gat att gta tct aag tta gtt ttt gac ttt gtg gaa tat gaa 1543
Val Asp Asp Ile Val Ser Lys Leu Val Phe Asp Phe Val Glu Tyr Glu
330 335 340

aag gac aca cct aaa aag aaa aga ata aaa tac agt gtt gga tcc ctt 1591
Lys Asp Thr Pro Lys Lys Arg Ile Lys Tyr Ser Val Gly Ser Leu
345 350 355

tct cct gtt tct gca agt gtc ctg aaa aag act gaa caa aag gaa aaa 1639
Ser Pro Val Ser Ala Ser Val Leu Lys Lys Thr Glu Gln Lys Glu Lys
360 365 370

gtg gaa ttg caa cat att tct cag aaa gat tgc cag gaa gat gat aca 1687

4 6 / 5 9

Val Glu Leu Gln His Ile Ser Gln Lys Asp Cys Gln Glu Asp Asp Thr
375 380 385 390

aca gtg aag gag cag aat ttc ctg tat aaa gag acc cag gaa act gaa 1735
aca gtg aag gag cag aat ttc ctg tat aaa gag acc cag gaa act gaa 1735
Thr Val Lys Glu Gln Asn Phe Leu Tyr Lys Glu Thr Gln Glu Thr Glu
395 400 405

aaa aag ctc ctg ttt att tca gag ccc atc ccc cac cct tca aat gaa 1783
aaa aag ctc ctg ttt att tca gag ccc atc ccc cac cct tca aat gaa 1783
Lys Lys Leu Leu Phe Ile Ser Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Glu
410 415 420

ttg aga ggg ctt aat gag aaa atg agt aat aaa tgt tcc atg tta agt 1831
ttg aga ggg ctt aat gag aaa atg agt aat aaa tgt tcc atg tta agt 1831
Leu Arg Gly Leu Asn Glu Lys Met Ser Asn Lys Cys Ser Met Leu Ser
425 430 435

aca gct gaa gat gac ata aga cag aat ttt aca cag cta cct cta cat 1879
aca gct gaa gat gac ata aga cag aat ttt aca cag cta cct cta cat 1879
Thr Ala Glu Asp Asp Ile Arg Gln Asn Phe Thr Gln Leu Pro Leu His
440 445 450

aaa aac aaa cag gaa tgc att ctt gac att tcc gaa cac aca tta agt 1927
aaa aac aaa cag gaa tgc att ctt gac att tcc gaa cac aca tta agt 1927
Lys Asn Lys Gln Glu Cys Ile Leu Asp Ile Ser Glu His Thr Leu Ser
455 460 465 470

gaa aat gac tta gaa gaa cta agg gta gat cac tat aaa tgt aac ata 1975
gaa aat gac tta gaa gaa cta agg gta gat cac tat aaa tgt aac ata 1975
Glu Asn Asp Leu Glu Glu Leu Arg Val Asp His Tyr Lys Cys Asn Ile
475 480 485

47 / 59

cag gca tct gta cat gtt tct gat ttc agt aca gat aat agt gga tct 2023
Gln Ala Ser Val His Val Ser Asp Phe Ser Thr Asp Asn Ser Gly Ser

490

495

500

caa cca aaa cag aag tca gat act gtg ctt ttt cca gca aag gat ctc 2071
Gln Pro Lys Gln Lys Ser Asp Thr Val Leu Phe Pro Ala Lys Asp Leu

505

510

515

aag gaa aag gac ctt cat tca ata ttt act cat gat tct ggt ctg ata 2119
Lys Glu Lys Asp Leu His Ser Ile Phe Thr His Asp Ser Gly Leu Ile

520

525

530

aca ata aac agt tca caa gag cac cta act gtt cag gca aag gct cca 2167
Thr Ile Asn Ser Ser Gln Glu His Leu Thr Val Gln Ala Lys Ala Pro

535

540

545

550

ttc cat act cct cct gag gaa ccc aat gaa tgt gac ttc aag aat atg 2215
Phe His Thr Pro Pro Glu Glu Pro Asn Glu Cys Asp Phe Lys Asn Met

555

560

565

gat agt tta cct tct ggt aaa ata cat cga aaa gtg aaa ata ata tta 2263
Asp Ser Leu Pro Ser Gly Lys Ile His Arg Lys Val Lys Ile Ile Leu

570

575

580

gga cga aat aga aaa gaa aat ctg gaa cca aat gct gaa ttt gat aaa 2311

48 / 59

Gly Arg Asn Arg Lys Glu Asn Leu Glu Pro Asn Ala Glu Phe Asp Lys

585

590

595

aga act gaa ttt att aca caa gaa gaa aac aga att tgt agt tca ccg 2359
Arg Thr Glu Phe Ile Thr Gln Glu Glu Asn Arg Ile Cys Ser Ser Pro

600

605

610

gta cag tct tta cta gac ttg ttt cag act agt gaa gag aaa tca gaa 2407
Val Gln Ser Leu Leu Asp Leu Phe Gln Thr Ser Glu Glu Lys Ser Glu
615 620 625 630ttt ttg ggt ttc aca agc tac aca gaa aag agt ggt ata tgc aat gtt 2455
Phe Leu Gly Phe Thr Ser Tyr Thr Glu Lys Ser Gly Ile Cys Asn Val
635 640 645tta gat att tgg gaa gag gaa aat tca gat aat ctg tta aca gcg ttt 2503
Leu Asp Ile Trp Glu Glu Asn Ser Asp Asn Leu Leu Thr Ala Phe
650 655 660ttc tcg tcc cct tca act tct aca ttt act ggc ttt tag aat taaa 2552
Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Thr Phe Thr Gly Phe
665 670 675atgcatactt ttcaagaatg ataaggatca tatttttggaa atttttataa atatgtatgg 2612
aaatttttag gatttttta ccagcttgc ttacagaccc aaatgtaaat attaaaaataa 2672
aatatggca attttctaca gaatttggata cctgtttaaag aaaaattaca gaataaaactt 2732

49 / 59

gtgactggtc ttgtttaca taaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aactcgag

2780

<210> 9

<211> 674

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Asn Ser Gly Ala Met Arg Ile His Ser Lys Gly His Phe Gln Gly

1

5

10

15

Gly Ile Gln Val Lys Asn Glu Lys Asn Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu

20

25

30

Lys Thr Asp Asn Arg Pro Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly

35

40

45

Lys Val Phe Tyr Leu Asp Leu Pro Ser Val Thr Ile Ser Glu Lys Leu

50

55

60

Gln Lys Asp Ile Lys Asp Leu Gly Gly Arg Val Glu Glu Phe Leu Ser

65

70

75

80

Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Ile Ser Asn Lys Lys Glu Ala Lys Phe Ala

85

90

95

Gln Thr Leu Gly Arg Ile Ser Pro Val Pro Ser Pro Glu Ser Ala Tyr

100

105

110

Thr Ala Glu Thr Thr Ser Pro His Pro Ser His Asp Gly Ser Ser Phe

115

120

125

Lys Ser Pro Asp Thr Val Cys Leu Ser Arg Gly Lys Leu Leu Val Glu

50 / 59

130 135 140
Lys Ala Ile Lys Asp His Asp Phe Ile Pro Ser Asn Ser Ile Leu Ser
145 150 155 160
Asn Ala Leu Ser Trp Gly Val Lys Ile Leu His Ile Asp Asp Ile Arg
165 170 175
Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Lys Ser
180 185 190
Ser Thr Ser Val Arg Asp Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser Gly Ala Gln
195 200 205
Lys Thr Arg Thr Gly Arg Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys Val Glu Asp
210 215 220
Met Ser Gln Leu Tyr Arg Pro Phe Tyr Leu Gln Leu Thr Asn Met Pro
225 230 235 240
Phe Ile Asn Tyr Ser Ile Gln Lys Pro Cys Ser Pro Phe Asp Val Asp
245 250 255
Lys Pro Ser Ser Met Gln Lys Gln Thr Gln Val Lys Leu Arg Ile Gln
260 265 270
Thr Asp Gly Asp Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Ile Gln Leu Gln Leu Lys
275 280 285
Glu Lys Lys Lys Gly Tyr Cys Glu Cys Cys Leu Gln Lys Tyr Glu
290 295 300
Asp Leu Glu Thr His Leu Leu Ser Glu Gln His Arg Asn Phe Ala Gln
305 310 315 320
Ser Asn Gln Tyr Gln Val Val Asp Asp Ile Val Ser Lys Leu Val Phe
325 330 335
Asp Phe Val Glu Tyr Glu Lys Asp Thr Pro Lys Lys Arg Ile Lys

51/59

340 345 350
Tyr Ser Val Gly Ser Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser Val Leu Lys Lys
355 360 365
Thr Glu Gln Lys Glu Lys Val Glu Leu Gln His Ile Ser Gln Lys Asp
370 375 380
Cys Gln Glu Asp Asp Thr Thr Val Lys Glu Gln Asn Phe Leu Tyr Lys
385 390 395 400
Glu Thr Gln Glu Thr Glu Lys Lys Leu Leu Phe Ile Ser Glu Pro Ile
405 410 415
Pro His Pro Ser Asn Glu Leu Arg Gly Leu Asn Glu Lys Met Ser Asn
420 425 430
Lys Cys Ser Met Leu Ser Thr Ala Glu Asp Asp Ile Arg Gln Asn Phe
435 440 445
Thr Gln Leu Pro Leu His Lys Asn Lys Gln Glu Cys Ile Leu Asp Ile
450 455 460
Ser Glu His Thr Leu Ser Glu Asn Asp Leu Glu Glu Leu Arg Val Asp
465 470 475 480
His Tyr Lys Cys Asn Ile Gln Ala Ser Val His Val Ser Asp Phe Ser
485 490 495
Thr Asp Asn Ser Gly Ser Gln Pro Lys Gln Lys Ser Asp Thr Val Leu
500 505 510
Phe Pro Ala Lys Asp Leu Lys Glu Lys Asp Leu His Ser Ile Phe Thr
515 520 525
His Asp Ser Gly Leu Ile Thr Ile Asn Ser Ser Gln Glu His Leu Thr
530 535 540
Val Gln Ala Lys Ala Pro Phe His Thr Pro Pro Glu Glu Pro Asn Glu

52/59

545 550 555 560
Cys Asp Phe Lys Asn Met Asp Ser Leu Pro Ser Gly Lys Ile His Arg
565 570 575
Lys Val Lys Ile Ile Leu Gly Arg Asn Arg Lys Glu Asn Leu Glu Pro
580 585 590
Asn Ala Glu Phe Asp Lys Arg Thr Glu Phe Ile Thr Gln Glu Glu Asn
595 600 605
Arg Ile Cys Ser Ser Pro Val Gln Ser Leu Leu Asp Leu Phe Gln Thr
610 615 620
Ser Glu Glu Lys Ser Glu Phe Leu Gly Phe Thr Ser Tyr Thr Glu Lys
625 630 635 640
Ser Gly Ile Cys Asn Val Leu Asp Ile Trp Glu Glu Asn Ser Asp
645 650 655
Asn Leu Leu Thr Ala Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Thr Phe Thr
660 665 670
Gly Phe

<210> 10

<211> 176

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Ile Arg Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu

53 / 59

Lys Lys Ser Ser Thr Ser Val Arg Asp Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser

20 25 30

Gly Ala Gln Lys Thr Arg Thr Gly Arg Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys

35 40 45

Val Glu Asp Met Ser Gln Leu Tyr Arg Pro Phe Tyr Leu Gln Leu Thr

50 55 60

Asn Met Pro Phe Ile Asn Tyr Ser Ile Gln Lys Pro Cys Ser Pro Phe

65 70 75 80

Asp Val Asp Lys Pro Ser Ser Met Gln Lys Gln Thr Gln Val Lys Leu

85 90 95

Arg Ile Gln Thr Asp Gly Asp Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Ile Gln Leu

100 105 110

Gln Leu Lys Glu Lys Lys Lys Lys Gly Tyr Cys Glu Cys Cys Leu Gln

Lys Tyr Glu Asp Leu Glu Thr His Leu Leu Ser Glu Gln His Arg Asn

130 135 140

5 4 / 5 9

Phe Ala Gln Ser Asn Gln Tyr Gln Val Val Asp Asp Ile Val Ser Lys
145 150 155 160

Leu Val Phe Asp Phe Val Glu Tyr Glu Lys Asp Thr Pro Lys Lys Lys
165 170 175

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

cccaagcttg acatttagata ctacattgaa

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

55/59

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

ccggaattct ttcttttag gtgtgtcctt

30

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:TAT sequence

<400> 13

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

56 / 59

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized adaptor sequence

<400> 14

12

aattgcggcc gc

<210> 15

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

52

ataagaatgc ggccgctaag aaggagatat acatatgtac ccctacgacg tg

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

57 / 59

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

ataagaatgc ggccgc ttat cacaaggctca tatcttt

37

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized peptide sequence

<400> 17

Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Phe Ser Pro Gln Arg Asp

1

5

10

15

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

58 / 59

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

cacggatcca tggcatccag cccggccca

29

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

gtgctcgagc atcgctgtca tacaggagcc

30

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

5 9 / 5 9

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized peptide sequence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 20

Cys Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr Ser Ser

1

5

10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized peptide sequence

<400> 21

Cys Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr Ser Ser

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02918

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12Q1/48, C12P21/02,
G01N33/50, 33/15, 33/53, A61K45/00, 38/00, 39/395,
A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12Q1/48, C12P21/02,
G01N33/50, 33/15, 33/53, A61K45/00, 38/00, 39/395,
A61P35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 60-185719 A (Ajinomoto Co., Inc.), 21 September, 1985 (21.09.85), Full text (Family: none)	7
X	OHMI K. et al., Induction of giant endothelial cells in culture by K-252a, a protein kinase inhibitor Jpn.J.Pharmacol., 1993, 63(2), pages 195 to 202	7
Y	ISHIMI Y. et al., Biochemical activities associated with mouse Mcm2 protein J.Biol.Chem., 2001, 276(46), p. 42744-52	1-9, 11

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* "A" Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 June, 2003 (13.06.03)	Date of mailing of the international search report 01 July, 2003 (01.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02918

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TODOROV I.T. et al., A human nuclear protein with sequence homology to a family of early S phase proteins is required for entry into S phase and for cell division. <i>J.Cell.Sci.</i> , 1994, 107(Pt1), p.253-65	1-9, 11
Y	KIMURA H. et al., Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus <i>Genes Cells</i> , 1996, 1(11), p.977-93	1-9, 11
Y	WARN-CRAMER B.J. et al., Characterization of the mitogenactivated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein <i>J.Biol.Chem.</i> , 1996, 271(7), p.3779-86	1-9, 11
Y	ZHANG Y. et al., Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. <i>In vitro phosphorylation by casein kinase II</i> <i>J.Biol.Chem.</i> , 1994, 269(49), p.31034-40	1-9, 11
Y	JP 2001-16398 A (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.), 19 June, 2001 (19.06.01), Full text (Family: none)	1-9, 11
Y	EP 1184665 A1 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.), 06 March, 2002 (06.03.02), Full text & WO 00/72011 A1 & JP 2000-325086 A	1-9, 11
Y	WO 01/11367 A1 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.), 15 February, 2001 (15.02.01), Full text & EP 1207395 A1 & JP 2001-515972 A	1-9, 11
Y	SUZUKI S. et al., Enzyme-linked immunosorbent assay for distinct cyclin-dependent kinase activities using phosphorylation-site-specific anti-pRB monoclonal antibodies <i>Anal.Biochem.</i> , 2002 February, 301(1), pages 65 to 74	1-9, 11
A	MASAI H. et al., Human Cdc7-related kinase complex. <i>In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdks and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 BY Cdks</i> <i>J.Biol.Chem.</i> , 2000, 275(37), p.29042-52	1-9, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02918

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 to 9 and 11

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02918

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)**<Subject of search>**

Claim 7 relates to a cell proliferation inhibitor which contains as the active ingredient a compound defined by a desired property "being selected by the screening method according to claim 6". Although claim 6 involves any cell proliferation inhibitors containing any compounds having the above property as the active ingredient, only part of the claimed compounds are disclosed in the meaning as described in PCT Article 5. Thus, it is considered that this claim is not supported by the disclosure in the description in the meaning as described in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the "cell proliferation inhibitor containing as the active ingredient a compound selected by the screening method according to claim 6" cannot be specified. Thus, claim 7 also fails to fulfill the requirement of clearness as described in PCT Article 6.

Such being the case, the search was made on cell proliferation inhibitors containing as the active ingredient the compounds specifically described as being selected by the screening method according to claim 6 (i.e., lowering the phosphorylation level by the kinase activity of the Cdc7-ASK kinase complex).

<Unity of Invention>

The matter common to claims 1 to 14 resides in a Cdc7-ASK complex, a method of assaying the kinase activity of the Cdc7-ASK complex using a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in the present application or a protein functionally equivalent thereto and relating to this method.

However, J. Biol. Chem., 2000, 275(37), p.29042-52 reported a Cdc7-ASK kinase complex and a method of assaying the kinase activity of the Cdc7-ASK complex with the use of mouse MCM2. Since it is recognized that this mouse MCM2 is equivalent to a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in the present application, the above common matter is described in the above document and, therefore, not novel.

Namely, the above common matter falls within the category of prior art and thus cannot be regarded as a special technical feature in the meaning as described in the second sentence in PCT Rule 13.2.

Accordingly, there is no matter common to all claims. Since there is no common matter seemingly being a special technical feature in the meaning as described in the second sentence in PCT Rule 13.2, there is no technical relevancy in the meaning of PCT Rule 13 among these inventions different from each other.

Therefore, it is obvious that claims 1 to 14 do not fulfill the requirement of unity of invention.

Such being the case, the claims have the following 4 groups of inventions:

- (1) the inventions as set forth in claims 1 to 9 and 11;
- (2) the invention as set forth in claim 10;
- (3) the invention as set forth in claim 12; and
- (4) the inventions as set forth in claims 13 to 14.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12Q1/48, C12P21/02, G01N33/50, 33/15, 33/53, A61K45/00, 38/00, 39/395, A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12Q1/48, C12P21/02, G01N33/50, 33/15, 33/53, A61K45/00, 38/00, 39/395, A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 60-185719 A(味の素株式会社) 1985. 09. 21 全文(ファミリーなし)	7
X	OHMI K. et al., Induction of giant endothelial cells in culture by K-252a, a protein kinase inhibitor Jpn. J. Pharmacol., 1993, 63(2), p. 195-202	7
Y	ISHIMI Y. et al., Biochemical activities associated with mouse Mcm2 protein J. Biol. Chem., 2001, 276(46), p. 42744-52	1-9, 11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 13.06.03	国際調査報告の発送日 01.07.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3447

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	TODOROV I. T. et al., A human nuclear protein with sequence homology to a family of early S phase proteins is required for entry into S phase and for cell division. J. Cell. Sci., 1994, 107(Pt1), p. 253-65	1-9, 11
Y	KIMURA H. et al., Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus Genes Cells, 1996, 1(11), p. 977-93	1-9, 11
Y	WARN-CRAMER B. J. et al., Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein J. Biol. Chem., 1996, 271(7), p. 3779-86	1-9, 11
Y	ZHANG Y. et al., Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II J. Biol. Chem., 1994, 269(49), p. 31034-40	1-9, 11
Y	JP 2001-161398 A(株式会社医学生物学研究所) 2001. 06. 19 全文(ファミリーなし)	1-9, 11
Y	EP 1184665 A1 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) 2002. 03. 06, 全文 & WO 00/72011 A1 & JP 2000-325086 A	1-9, 11
Y	WO 01/11367 A1(株式会社医学生物学研究所) 2001. 02. 15 全文 & EP 1207395 A1 & JP 2001-515972 A	1-9, 11
Y	SUZUKI S. et al., Enzyme-linked immunosorbent assay for distinct cyclin-dependent kinase activities using phosphorylation-site-specific anti-pRB monoclonal antibodies Anal. Biochem., 2002 Feb, 301(1), p. 65-74	1-9, 11
A	MASAI H. et al., Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdks and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 BY Cdks J. Biol. Chem., 2000, 275(37), p. 29042-52	1-9, 11

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない
国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に
従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-9, 11

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲7は、「請求項6のスクリーニング方法によって選択される」という所望の性質により定義された化合物を有効成分として含有する、細胞増殖の抑制剤に関するものである。そして、請求の範囲7はそのような性質を有するあらゆる化合物を有効成分として含有する、細胞増殖の抑制剤を包含するものであるが、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎず、PCT6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「請求項6のスクリーニング方法によって選択される化合物を有効成分として含有する、細胞増殖の抑制剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲7は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は明細書において、請求項6のスクリーニング方法によって選択される（すなわち、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性によるリン酸化レベルを低下させる）ことが具体的に記載されている化合物を有効成分として含有する、細胞増殖の抑制剤について行った。

<発明の單一性について>

請求の範囲1-14に共通の事項は、Cdc7-ASK複合体と、本願配列番号1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質とを用いる、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法およびそれに関するものであると認められる。

しかしながら、J. Biol. Chem., 2000, 275 (37), p. 29042-52には、Cdc7-ASK複合体およびマウスMCM2を用いるCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法が記載されており、該マウスMCM2は本願配列番号1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質と認められるので、上記共通事項は、該文献に記載されており、新規でないことが明らかとなった。

即ち、上記共通事項は先行技術の域を出ないので、PCT規則13.2の第2文の意味における特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲1-14は單一性の要件を満たしていないことは明らかである。

したがって、請求の範囲には、

- ①請求の範囲1-9, 11に記載の発明、
- ②請求の範囲10に記載の発明
- ③請求の範囲12に記載の発明
- ④請求の範囲13-14に記載の発明

の4発明が記載されている。